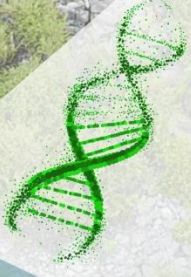


**FILOGEOGRAFIA DE INVERTEBRADOS  
CAVERNÍCOLAS EM FORMAÇÕES  
FERRÍFERAS E CARBONÁTICAS**



**EVOLUÇÃO E CONECTIVIDADE BIOLÓGICA EM  
AMBIENTES SUBTERRÂNEOS COMO  
DEFINIDORES DE AÇÕES DE CONSERVAÇÃO**



**COORDENADOR**

**DIEGO DE MEDEIROS BENTO**  
Analista Ambiental ICMBio/Cecav

✉ [diego.bento@icmbio.gov.br](mailto:diego.bento@icmbio.gov.br)

🌐 <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cavernas>



**TCCE ICMBio / VALE**  
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

Termo de compromisso

Coordenação Executiva

Gestão Operacional



SETEMBRO 2024

# SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. PROJETO ORIGINAL</b>	<b>02</b>
<b>2.1. Introdução geral</b>	<b>02</b>
<b>2.2. Espécies alvo</b>	<b>04</b>
2.2.1. Troglóbios da Formação Jandaíra (RN)	<b>04</b>
2.2.2. Troglófilos da Formação Jandaíra (RN)	<b>06</b>
2.2.3. Troglóbios da Formações Carajás (PA)	<b>07</b>
<b>2.3. Objetivos</b>	<b>07</b>
<b>2.4. Metodologia</b>	<b>08</b>
2.4.1. Formação Jandaíra (RN)	<b>08</b>
2.4.2. Formação Carajás (PA)	<b>11</b>
2.4.3. Análises moleculares	<b>12</b>
<b>2.5. Resultados esperados</b>	<b>14</b>
<b>3. PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Filogeografia de artrópodes troglóbios do oeste da Formação Jandaíra, Nordeste do Brasil: Evolução e conectividade biológica em ambientes subterrâneos como base para ações de conservação</b>	<b>16</b>
3.1.1. Resumo geral	<b>16</b>
3.1.2. Introdução geral	<b>17</b>
3.1.3. Objetivos	<b>22</b>
3.1.4. Hipóteses e predições	<b>23</b>
3.1.5. Artigo: Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid	<b>25</b>



3.1.6. Um novo hotspot de biodiversidade subterrânea no Nordeste brasileiro	37
3.1.7. Vida nas CaveRNas: proposta de cartilha como ferramenta de educação ambiental e material didático no ensino de Ciências	46
<b>3.2. Taxonomia de tricládidos aquáticos (Platyhelminthes) em ambientes espeleológicos da região Neotropical</b>	52
3.2.1. Resumo geral	55
3.2.2. Introdução geral	57
3.2.3. Objetivos	58
3.2.4. Capítulo I - Unexpected diversity of troglobitic <i>Hausera</i> (Cavernicola: Dimarcusidae) in limestone caves of a semiarid Brazilian environment with the description of three new species	59
<b>3.3. Taxonomia iterativa de crustáceos troglóbios do gênero <i>Potiberaba</i> Fišer, Zagmajster &amp; Ferreira 2013 (Crustacea: Amphipoda) na Caatinga</b>	66
3.3.1. Resumo geral	66
3.3.2. Introdução geral	67
3.3.3. Objetivos	68
3.3.4. Destaques e principais resultados	69
<b>3.4. Revisão de <i>Trogolaphysa</i> Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), com a descrição de novas espécies, Domínio da Caatinga, Brasil</b>	76
3.4.1. Resumo geral	76
3.4.2. Introdução geral	77



3.4.3. Objetivos	79
3.4.4. Capítulo 1: Review of <i>Trogolaphysa</i> Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae)	80
3.4.5. Capítulo 2: Two new species of <i>Trogolaphysa</i> Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae) from caves in Caatinga of Rio Grande do Norte State, Brazil	82
3.4.6. Considerações finais	86
<b>3.5. Filogeografia do grilo <i>Endecous potiguar</i> Castro-Souza, Zefa &amp; Ferreira, 2017 (Orthoptera, Phalangopsidae): Investigação de linhagens crípticas em cavernas na Formação Jandaíra</b>	<b>86</b>
3.5.1. Resumo geral	87
3.5.2. Introdução geral	87
3.5.3. Objetivos	90
3.5.4. Destaques e resultados	90
3.5.5. Considerações finais	94
<b>3.6. Filogeografia de <i>Rowlandius potiguar</i> Santos, Ferreira &amp; Buzzato, 2013 (Arachnida: Schizomida: Hubbardiidae) nas cavernas da Caatinga</b>	<b>95</b>
3.6.1. Resumo geral	96
3.6.2. Introdução geral	97
3.6.3. Objetivos	98
3.6.4. Hipóteses e predições	99
3.6.5. Destaques e resultados	100
3.6.6. Considerações finais	106



<b>3.7. Living in the subterranean time: Exploring biological rhythms in cave invertebrates</b>	<b>107</b>
3.7.1. Resumo geral	109
3.7.2. Introdução geral	110
3.7.3. Capítulo III – We prefer nighttime, they prefer daytime: Biological thym variability in cave-dwelling amblypygids (Amblypygi: Charinidae) in the Neotropics	112
3.7.4 Considerações finais	120
<b>3.8. O meio subterrâneo superficial e a conectividade biológica no sistema ferrífero de Carajás</b>	<b>121</b>
3.8.1. Resumo geral	122
3.8.2. Introdução geral	123
3.8.3. A comunidade de artrópodes associada ao Meio Subterrâneo Superficial (MSS) no sistema ferrífero de Carajás e a influência de fatores ecológicos estruturantes	126
3.8.3. Análise da estrutura genética de populações de <i>Pseudoporatia</i> sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae) na Formação Ferrífera de Carajás como indicativo de conectividade do habitat subterrâneo	136
3.8.4 Considerações finais	143
<b>4. DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO</b>	<b>145</b>
<b>5. DISCUSSÃO ACERCA DOS RESULTADOS DO PROJETO</b>	<b>148</b>
<b>6. PRINCIPAIS AVANÇOS NA IMPLEMENTAÇÃO DO PNCPE</b>	<b>153</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>160</b>



## 1. APRESENTAÇÃO

Este relatório tem por objetivo descrever as atividades realizadas e os principais resultados alcançados no âmbito do projeto “Filogeografia de invertebrados cavernícolas em formações ferríferas e carbonáticas: Evolução e conectividade biológica em ambientes subterrâneos como definidores de ações de conservação”. O projeto foi inserido no Termo de Compromisso de Compensação Espeleológica (TCCE) N° 1/2018, firmado entre o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a Vale S.A., com coordenação executiva do ICMBio/Cecav e gestão operacional do IABS.

O projeto teve suas atividades iniciadas em 2018, e contou com a coordenação da Base Avançada do ICMBio/Cecav no Rio Grande do Norte e parcerias da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Universidade de Brasília (UnB) e Universidade Federal do Piauí (UFPI).

A seguir, apresentaremos o projeto original (de forma resumida), os principais resultados alcançados, as publicações resultantes do projeto e as dificuldades encontradas durante a sua execução. Além disso, será feita uma comparação entre os objetivos e metas iniciais e as efetivamente alcançadas ao final do projeto, bem como serão discutidos os principais avanços na implementação dos componentes do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (PNCPE) (Portaria MMA N° 358/2009).



## 2. PROJETO ORIGINAL

### 2.1. Introdução geral

O meio subterrâneo compreende os espaços interconectados do subsolo, com dimensões variáveis, que foram formados em rocha maciça e estão preenchidos por água ou ar (Juberthie 2000). As porções do ambiente subterrâneo acessíveis ao ser humano são chamadas de cavernas, e têm como características gerais a ausência permanente de luz e tendência à temperatura constante e alta umidade em suas zonas mais profundas (Culver 1982).

Organismos com pré-adaptações a estas características podem usar o ambiente subterrâneo como abrigos diurnos ou noturnos (trogloxenos) e/ou completar seu ciclo de vida dentro ou fora de cavernas (troglófilos). Entretanto, algumas espécies são restritas a habitats subterrâneos, geralmente apresentando especializações comportamentais, morfológicas e fisiológicas para a sobrevivência exclusiva no ambiente hipógeo (troglóbios) (Sket 2008). Em função disso, cavernas são importantes ambientes para a realização de estudos ecológicos e evolutivos, incluindo processos de especiação (Culver & Pipan 2009).

No Brasil, dentre as diversas litologias propícias à formação de cavernas, destacam-se as formações calcárias, apresentando em sua maioria cavernas com pouca ramificação nos condutos, grande projeção horizontal e volume, e as formações ferríferas, apresentando cavernas de pequeno a médio porte, encaixada em rocha com grande porosidade (canga), permitindo à fauna subterrânea conexão entre cavidades. Tais litologias apresentam a maior quantidade de cavernas conhecidas, que abrigam a maior parte das espécies troglóbias atualmente conhecidas no Brasil. Assim, estudos que visem entender a distribuição da fauna troglóbia em cavernas dessas litologias, bem como investigar a existência de possíveis padrões de conectividade biológica subterrânea, são prioritários e têm possíveis implicações nas tomadas de decisão envolvendo a conservação da biodiversidade subterrânea em todo o país.

Estudos recentes têm apontado o RN, particularmente a região Oeste do Estado, como uma das áreas mais relevantes do ponto de vista bioespeleológico no cenário nacional (Bento et al. 2021). A riqueza e diversidade observadas na área são comparáveis a outras regiões cársticas e pseudocársticas brasileiras, destacando-se pela quantidade de espécies troglóbias, inclusive com as únicas consideradas relictos oceânicos no país (Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2021).

Há registro de 75 morfoespécies troglomórficas encontradas em cavernas inseridas nos calcários da Formação Jandaíra, incluindo diversos relictos filogenéticos, filogeográficos e os únicos relictos oceânicos atualmente conhecidos no Brasil (Ferreira et al. 2010, Bento 2011, Bento et al. 2015). Há também várias espécies não troglomórficas de interesse para a conservação (Bento et al. 2021).

No caso das formações ferríferas, embora o conhecimento tenha avançado significativamente nos últimos anos, a vida subterrânea associada a cavernas ferríferas ainda é pouco estudada no Brasil quando comparado ao histórico de estudos associados às cavernas inseridas em litologias carbonáticas (Bichuette et al. 2015). Essa biodiversidade distribui-se de maneira heterogênea no país em regiões onde temos afloramentos na forma de canga, principalmente nas regiões de Carajás, no estado do Pará, e no Quadrilátero ferrífero, em Minas Gerais, e as milhares de cavernas ferríferas encontradas nessas regiões abrigam centenas de espécies troglóbias, principalmente na região de Carajás.

A formação ferrífera está entre os ecossistemas mais peculiares, intrigantes e desconhecidos para a ciência. Formados há bilhões de anos, esses geossistemas, composto por uma couraça superficial de limolita, conhecida como canga, recobre as Formações Ferríferas Bandadas (FFB) formadas principalmente por itabiritos e hematitas, minérios ricos em ferro e altamente visados pelo setor minerário (Carmo, 2010).

A fauna cavernícola tem padrões únicos de distribuição, geralmente apresentando distribuição geográfica restrita e altos níveis de endemismos em todas as escalas de avaliação (Gibert & Deharveng 2002). Assim, este projeto pretende compreender, por meio de uma abordagem integrativa e

filogeográfica, como algumas linhagens (espécies e populações) de troglóbios e troglófilos alvo estão distribuídas nas cavernas da porção oeste da Formação Jandaíra e na Formação Carajás. Pretende-se gerar dados que ajudem a esclarecer os padrões e processos evolutivos de taxa que colonizaram o ambiente subterrâneo, ajudando a esclarecer a distribuição de tais espécies nas diferentes cavernas, gerando informações para conservação e gestão dessas áreas.

## **2.2. Espécies alvo**

### 2.2.1. Troglóbios da Formação Jandaíra (RN)

Em função de sua relevância como relictos, processos evolutivos envolvidos e/ou padrões de distribuição, alguns grupos de invertebrados troglóbios foram escolhidos como alvos do projeto. Destacam-se ainda as potenciais implicações do aumento do conhecimento sobre essas espécies para a conservação de ambientes subterrâneos e até mesmo para o entendimento de processos geológicos envolvidos na evolução da Bacia Potiguar.

Algumas espécies estigóbias (troglóbias aquáticas) são consideradas relictos oceânicos, pois aparentemente evoluíram a partir de ancestrais marinhos "aprisionados" em espaços subterrâneos após eventos pretéritos de avanço e posterior regressão oceânica (Ferreira et al. 2010, Leal-Zanchet et al. 2015, Souza et al. 2018). Até então, não eram conhecidas no Brasil espécies subterrâneas nesta condição. Estas espécies advêm de grupos cuja distribuição é predominantemente marinha e compreendem isópodes da família Cirolanidae, anfípodes e planárias.

Os cirolanídeos encontrados em cavernas da Formação Jandaíra compreendem os primeiros registros de troglóbios desta família no Brasil, e o segundo registro na América do Sul (Ferreira et al. 2010). Há o registro de 13 populações de cirolanídeos troglóbios em cavernas na Formação Jandaíra (12 no RN e uma no Ceará), provavelmente pertencentes a dois gêneros novos (todas prováveis espécies novas).

A maioria das linhagens de anfípodes na América do Sul vive em águas subterrâneas. Há o registro de 12 populações de anfípodes troglóbios em

cavernas na Formação Jandaíra, sendo 10 de espécies do gênero *Potiberaba* e duas do gênero *Seborgia*.

Duas espécies de planárias troglóbias, pertencentes a subordens distintas (Cavernicola e Maricola) (Leal-Zanchet et al. 2014, Leal-Zanchet et al. 2015, Souza et al. 2017), ocorrem em cavernas do município de Felipe Guerra/RN, enquanto em outras regiões cársticas brasileiras há registro apenas de representantes da subordem Continenticola. Embora essas duas espécies tenham sido encontradas apenas nas cavernas dos Crotos e Três Lagos, respectivamente, há outras duas populações de planárias troglomórficas, cujas espécies ainda não estão descritas: uma na gruta Olho d'água do Mamede, em Jandaíra/RN, e outra na Furna Feia, em Baraúna/RN. As planárias da caverna dos Três Lagos pertencem à subordem Maricola, um grupo primariamente marinho (Leal-Zanchet et al. 2015, Souza et al. 2017).

Dentre os troglóbios terrestres merece destaque o hemíptero *Kinnapotiguara troglobia* (Hoch & Ferreira 2013). As populações estão distribuídas em várias cavernas em Felipe Guerra e Gov. Dix-Sept Rosado, condição explicada pela possível existência de conectividade entre as cavernas da região (Bento 2011). Esta conectividade seria mantida por um sistema de micro e mesocavernas, não acessíveis diretamente ao ser humano, e pode facilitar a dispersão subterrânea e assim manter o fluxo gênico entre as populações (Hoch & Ferreira 2013). As populações de *K. troglobia* estão distribuídas em uma grande área e das 13 cavernas onde foram encontrados espécimes, dez estão a oeste e três a leste do rio Apodi-Mossoró. Foram identificadas pequenas variações na morfologia genital masculina entre indivíduos de diferentes cavernas que podem ser indícios de especiação, de forma que mais pesquisas são necessárias para esclarecer o status específico dessas linhagens (Hoch & Ferreira 2013). Da mesma forma, a ocorrência de populações em cavernas de ambas as margens do rio Apodi-Mossoró pode representar uma barreira geográfica a ser testada.

Os colêmbolos são artrópodes hexápodes, semelhantes em forma a insetos, que são frequentemente encontrados associados ao solo (Hopkin 1997). São animais bastante comuns em diversos habitats, porém pouco conhecidos

pela população em geral, especialmente por causa do seu tamanho reduzido (cerca de 1mm) (Bellinger et al. 1996-2017). O reduzido número de espécies reconhecidas para a região Neotropical não condiz com sua grande diversidade de habitats, e claramente está relacionado a um baixo esforço de coleta. No Brasil, por exemplo, foram registradas aproximadamente 287 espécies, representando 92 gêneros em 19 famílias (Abrantes et al. 2010, 2012). Esse número é certamente incapaz de refletir a composição faunística existente no país e é fruto de amostragem limitada (Culik & Zeppelini 2003). Diversos estados do país não foram adequadamente estudados. Este é o caso do Rio Grande do Norte, onde poucas amostragens pontuais foram feitas até o momento (Bellini et al. 2010, Bento 2011, Santos-Rocha et al. 2011).

Uma alta diversidade de Collembola em ambientes cavernícolas no Rio Grande do Norte é esperada, tendo em vista a capacidade de isolamento populacional criado pelo ambiente cavernícola, em especial para espécies troglófilas e troglóbias, como é o caso de espécies dos gêneros *Pseudosinella*, *Troglobius* e *Troglolaphysa*. Nestes três gêneros são observadas pré-adaptações para a vida cavernícola, como enfraquecimento da cutícula, ausência (ou redução) de olhos e pigmento, alongamento dos apêndices e aumento das cerdas e outros órgãos sensoriais em regiões terminais do corpo (Hopkin 1997, Bellinger et al. 1996-2017). É válido ressaltar que a fauna de Paronellidae encontrada em cavernas no Rio Grande do Norte é totalmente composta por novas espécies, o que demonstra a carência de especialistas atuantes no grupo, além da falta de inventários de Collembola para cavernas encontradas na Caatinga.

### 2.2.2. Troglófilos da Formação Jandaíra (RN)

Além das espécies troglóbias acima, serão alvos do projeto populações de espécies atualmente consideradas troglófilas, caso de *Rowlandius potiguar* Santos, Ferreira & Buzatto, 2013 (Arachnida: Schizomida: Hubbardiidae) e de *Endecous potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2017 (Ensifera: Phalangopsidae).

Tais espécies são abundantes e amplamente distribuídas em cavernas na região Oeste do RN, no entanto a falta de conhecimento sobre sua ocorrência,

distribuição e abundância no ambiente epígeo levanta dúvidas sobre o status ecológico-evolutivo e possível isolamento de populações no ambiente subterrâneo.

### 2.2.3. Troglóbios da Formações Carajás (PA)

Com base nos levantamentos mais recentes feitos na Serra do Tarzan em Carajás, as espécies troglóbias foram pré-selecionadas com base no número de ocorrência em cavidades, taxonomicamente resolvidas e com elevada capacidade de mobilidade pelo sistema. O crustáceo da família Circoniscidae *Circoniscus buckupi* e o aracnídeo da família Caponiidae, *Carajas paraua* apresentam esses requisitos. Contudo, após as primeiras atividades de campo, outras espécies poderão ser selecionadas.

## 2.3. Objetivos

O objetivo geral do projeto é compreender os padrões de distribuição de espécies de invertebrados troglóbios aquáticos (Amphipoda, Cirolanidae (Isopoda) e Tricladida) e terrestres (Kinnaridae (Hemiptera:Fulgoromorpha) e Collembola), além de espécies atualmente consideradas troglófilas (*R. Potiguar* e *E. potiguar*) e os processos evolutivos ocorridos na Formação Jandaíra, bem como de troglóbios na Formação Carajás, por meio de análises moleculares, taxonomia integrativa e análises baseadas em cronobiologia e bioacústica, gerando conhecimento aplicado à conectividade biológica em ambientes subterrâneos e à sua conservação.

Os objetivos específicos são:

- Promover a coleta dos espécimes de acordo com as metodologias definidas, tanto nas cavidades quando em furos de sondagem (para a formação Carajás);
- Fazer análise exploratória com códigos de barra de DNA para delimitação e seleção de espécies alvo;
- Selecionar táxons para análises genômicas (NGS) filogenéticas e filogeográficas visando determinar parâmetros populacionais, tempo de

divergência entre linhagens e fluxo gênico entre linhagens de diferentes cavernas;

- Gerar informações moleculares para complementar a descrição morfológica de espécies novas, em uma abordagem integrativa, bem como subsidiar revisões taxonômicas que porventura sejam necessárias;

- Avaliar a conectividade subterrânea e fluxo gênico entre populações (tanto entre cavernas como entre populações epígeas e hipógeas) por meio de análises moleculares e baseadas em bioacústica e cronobiologia;

- Comparar a conectividade biológica subterrânea, para os ambientes terrestres, entre os calcários da formação Jandaíra e o geossistema ferrífero da formação Carajás;

- Delimitar as espécies e populações de taxa troglóbios e troglófilos de interesse e, junto com informações sobre padrões de conectividade biológica e grau de endemismo, gerar conhecimento aplicável à conservação e gestão do patrimônio espeleológico nas áreas alvo;

- Promover publicações técnicas e científicas que venham gerar conhecimento aplicável à conservação e gestão do patrimônio espeleológico, tanto de uma forma ampla quanto aplicado às regiões de estudo.

## **2.4. Metodologia**

### 2.4.1. Formação Jandaíra (RN)

#### *Área de Estudo*

O estudo será conduzido em cavernas inseridas nos calcários da Formação Jandaíra, nos municípios de Felipe Guerra, Gov. Dix-Sept Rosado, Caraúbas, Apodi, Upanema, Mossoró e Baraúna, no RN, e em Quixeré, no Ceará. Tendo em vista a distribuição de *R. potiguar*, também serão realizadas atividades pontuais no município de Martins/RN (caverna Casa de Pedra de Martins e outras próximas, inseridas em mármores da Formação Jucurutu), bem como buscas em cavernas calcárias (também da Formação Jandaíra) em Jandaíra/RN por populações de Kinnaridae e Tricladida troglomórficas (grutas dos Fugitivos e

Olho d'água do Mamede). Apesar de toda a área estar inserida no Bioma Caatinga, há várias regiões hidrográfica e geologicamente distintas.

### *Coleta de espécimes*

Em junho/julho de 2016 e abril/maio de 2017 foram realizadas campanhas de campo para coleta de espécimes, de forma que parte do material necessário às análises já se encontrava coletado e parcialmente analisado antes do início oficial do projeto.

Além do material já coletado, serão feitas coletas adicionais por meio de procura visual detalhada em todos os potenciais habitats para as espécies de interesse. Os invertebrados terrestres (Kinnaridae, Collembola, *R. potiguar* e *E. potiguar*) e as planárias serão coletados manualmente com o uso de pinças e pincéis, além de aspiradores entomológicos e armadilhas específicas. Já para os invertebrados aquáticos, serão utilizados também covos iscados.

Todos os invertebrados coletados serão conservados em etanol absoluto para análises morfológicas e moleculares, bem como acondicionados em recipientes térmicos (caixas de isopor/géis conservantes e refrigerador portátil veicular) durante o transporte desde os locais de coleta até os locais de pernoite, onde serão condicionados em refrigerador/freezer, e destes ao laboratório.

Para as espécies consideradas troglófilas serão realizadas coletas também no ambiente epígeo, nas proximidades das cavernas onde ocorrem populações hipógeas, objetivando verificar a ocorrência e abundância em superfície, bem como garantir material necessário às análises morfológicas e moleculares.

### *Caracterização dos habitats subterrâneos e superficiais*

Será feita uma caracterização básica dos locais de coleta e descrição do substrato para os ambientes terrestre e aquático, tanto das cavernas como do entorno. Será realizado também registro fotográfico do habitat das espécies alvo e, sempre que possível, dos espécimes vivos *in loco*.

### *Análise morfológica dos espécimes*

O material coletado será triado e identificado até o menor nível taxonômico possível na UFRN, e encaminhado para confirmação dos táxons e possível descrição de novas espécies, que seguirá metodologia específica para cada grupo taxonômico.

### *Bioacústica e cronobiologia*

Serão utilizadas abordagens bioacústica e/ou cronobiológica para os táxons troglófilos, *E. potiguar* e *R. potiguar*.

No caso de *E. potiguar*, as análises morfológicas indicaram que há variações na distribuição de nervuras das asas de muitos espécimes examinados, o que pode significar linhagens evolutivas distintas para diferentes cavernas onde a espécie ocorre. Tendo em vista que uma característica fundamental destes organismos é a comunicação acústica, onde os indivíduos machos adultos estridulam para atrair parceiros para reprodução, a bioacústica é uma ferramenta promissora para testar a conectividade das populações e espécies de grilos em muitas cavernas. A literatura mostra que divergências sonoras precedem divergências morfológicas dentro de Orthoptera (Leroy 1965, Otte 1992), tornando os sinais acústicos importantes caracteres para diferenciação e diagnóstico de muitas espécies com morfologia similar (Alexander 1957, Walker 1964, David et al. 2003).

Para as análises cronobiológicas, após a coleta e sucesso na manutenção de indivíduos das populações selecionadas em cativeiro, o ritmo de atividade de repouso será registrado por meio de uma câmera acoplada a um computador via USB. A iluminação será feita por uma luz do tipo infravermelha, ligada de forma constante para não servir como uma pista temporal para os animais. Um software irá transformar o vídeo em nível de movimentação e irá registrar a cada minuto a intensidade de locomoção do animal. Os animais serão mantidos em uma das três condições por 21 dias: iluminação constante com uma luz de intensidade de 100 lux, escuro constante e um ciclo de 12 horas de claro (100 lux) e 12 horas de escuro. A partir dos dados coletados, serão calculados periodogramas para

identificar o período principal e a sua potência. Sobre a atividade e repouso calcularemos o tempo total de fase ativa, de fase inativa e os ângulos de fase entre o claro/escuro e o início e fim de atividades. Para caracterização da dinâmica temporal em diferentes escalas, utilizaremos análises de dinâmica não linear.

#### 2.4.2. Formação Carajás (PA)

Na formação ferrífera em Carajás, a análise da disposição espacial e conectividade do meio subterrâneo será realizada primeiramente por meio do levantamento de dados das características geológicas relacionadas à porosidade no minério em cada litologia associada às formações ferríferas. Tais dados já estão disponíveis e podem ser obtidos nos estudos de impactos ambientais (EIA).

Nesta etapa, deverá ser avaliada a quantidade de espaços vazios disponíveis nas áreas estudadas e os fatores físicos que afetam a conectividade, como disposição espacial destas litologias no subsolo, profundidade e distância entre as cavidades, contrapondo os resultados obtidos a um mapa geológico detalhado tanto da área de estudo quanto da região.

A análise da utilização do meio subterrâneo (canalículos) pela fauna será realizada por meio de armadilhas dispostas em um Grid levando em consideração a influência ecológica dos diferentes Geoambientes Superficiais Associados (GSA - unidades de paisagem) encontrados, bem como para estudar o efeito da sazonalidade na composição da fauna.

Com isso será possível observar as diferentes riquezas presente no sistema de canalículos relacionando-a aos capões de mata, campos rupestres e campos brejosos, com intuito de comparar e indicar a ocupação real pelas espécies, observando como a qualidade ambiental interfere na ocupação do meio subterrâneo pelas espécies, e monitorando o fluxo migratório entre as cavidades longo do tempo.

A Caracterização das populações se dará por meio da coleta de indivíduos nas cavidades e os canalículos proverão a informação de indivíduos coletados, a fim de verificar sua população de origem. A análise da dinâmica populacional se

dará através da análise da e estrutura genética das populações alvo. Para acessar os canalículos serão realizados 32 furos de sondagem.

Posteriormente, todo o material coletado será triado e identificado até o menor nível taxonômico possível e encaminhado para especialistas para confirmação dos táxons e possível descrição de novas espécies. Parte do material coletado será encaminhado ao ITV-DS para as etapas de extração, isolamento, amplificação e sequenciamento do material genético.

### 2.4.3. Análises moleculares

#### *Extração, amplificação e sequenciamento de DNA*

O DNA total será extraído de tecidos dos indivíduos preservados em etanol utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para uma primeira etapa do projeto (análise exploratória), serão obtidas sequências parciais do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade I (cox1), amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers LCO-1490 (forward) e HCO-2198 (reverse) descritos por Folmer et al. (1994).

Serão obtidas sequências de outros marcadores moleculares mitocondriais (como 12S e 16S) e nucleares (como ITS, 18S e 28S), utilizando primers e parâmetros de reações de PCR e de sequenciamento específicos, a depender do grupo taxonômico e das hipóteses envolvidas.

Todos os produtos de PCR serão primeiramente visualizados em gel de agarose 1,2%, purificados e posteriormente utilizados em uma reação de PCR de sequenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3730-Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Essas etapas serão realizadas no Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITD-DS), em Belém/PA.

#### *Análise dos dados*

As sequências resultantes serão montadas no programa Geneious Prime (Biomatters Ltd.) e alinhadas por meio do pacote MAFFT 7.017 (Katoh & Standley

2013) utilizando o algoritmo Auto, ou usando ClustalW (Thompson et al. 1994), implementado no programa Mega X (Kumar et al. 2018), com posteriores ajustes manuais. A escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos da região de DNA será feita no programa JmodelTest 2 (Darriba et al. 2012).

Análises filogenéticas de máxima verossimilhança e bayesianas serão feitas nos programas Mega X (Kumar et al. 2018) ou RAxML 8 (Stamatakis 2014), implementado no Geneious Prime, e no Beast 2 (Bouckaert et al. 2019), respectivamente.

Com o objetivo de identificar unidades taxonômicas operacionais (UTOs, aqui interpretadas como potenciais novas espécies), serão utilizados diferentes métodos de delimitação de linhagens (tais como ABGD, ASAP, GMYC, PTP, BAPS e BPP) para verificar a distribuição dos grupos genéticos nos táxons-alvo. Posteriormente, distâncias genéticas médias intra (entre indivíduos de uma mesma UTO) e interespecíficas (entre indivíduos de diferentes UTOs) serão estimadas com o modelo de substituição K2P, usando o programa MEGA X.

O software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) será usado para realizar análises e testes de hipóteses filogeográficas, tais como a análise de variância molecular (AMOVA), e estimativas de fluxo gênico. As análises filogeográficas também envolverão a construção de redes de haplótipos (programa PopART, Leight & Bryant 2015) e a delimitação de populações por meio de análises espaciais de variância molecular (SAMOVA, Dupanloup et al. 2002) ou utilizando programas como o Geneland (Guillot et al. 2005) e o STRUCTURE (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003).

### *Sequenciamento de Nova Geração (NGS)*

Para a obtenção de sequências genômicas, a preparação da biblioteca do tipo mate-paired, paired-end ou shotgun de DNA genômico total será construída a partir de 1 µg de DNA. Em seguida, a amostra será submetida a uma reação de fragmentação aleatória na qual o DNA será simultaneamente fragmentado e ligado a adaptadores específicos utilizando o kit Nextera® mate-paired DNA Sample Preparation (Illumina). Em seguida, o DNA genômico será purificado e

submetido a uma reação de amplificação utilizando iniciadores complementares aos adaptadores. Os produtos serão quantificados através do qPCR utilizando o Kit Sybr FastqPCR kit (Kapa). As bibliotecas serão diluídas em uma solução de Tris-HCl e Tween 0,1%, depositadas em uma flowchip e submetidas a uma etapa de clusterização utilizando o kit TruSeq PE Cluster v3 – cBot - HS seguida do sequenciamento utilizando o kit TruSeq SBS kit v3 - HS de 200 ciclos (Illumina). Para cada espécie alvo serão geradas bibliotecas do tipo shotgun que permitirão, ao menos, o sequenciamento do genoma mitocondrial.

## **2.5. Resultados esperados**

Os principais resultados esperados com a execução do projeto são:

- Compreensão apurada da constituição biótica cavernícola da Formação Jandaíra;
- Compreensão da diversidade dos táxons estudados e de sua história evolutiva;
- Determinação de padrões de distribuição de populações e espécies de invertebrados troglóbios aquáticos e terrestres nas áreas de estudo, além de espécies atualmente consideradas troglófilas na Formação Jandaíra (RN);
- Proposição de modelos de evolução biológica para os táxons alvo, a partir de dados de distribuição, fluxo gênico e tempo de divergência entre as linhagens;
- Proposição de modelos de conectividade em ambientes subterrâneos aquáticos e terrestres na Formação Jandaíra, e terrestre na Formação Carajás, baseados na dispersão da fauna cavernícola;
- Proposição de ações voltadas à conservação e gestão do patrimônio espeleológico das áreas alvo.

### 3. PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

O projeto foi subdividido em diversos subprojetos, de acordo com as áreas e espécies alvo. São eles:

#### *Espécies troglóbias da Formação Jandaíra (RN):*

- Filogeografia de artrópodes troglóbios do oeste da Formação Jandaíra, Nordeste do Brasil: Evolução e conectividade biológica em ambientes subterrâneos como base para ações de conservação;
- Taxonomia de tricládidos aquáticos (Platyhelminthes) em ambientes espeleológicos da região Neotropical;
- Taxonomia iterativa de crustáceos troglóbios do gênero *Potiberaba* Fišer, Zgamažster & Ferreira 2013 (Crustacea: Amphipoda) na Caatinga;

#### *Espécies troglófilas da Formação Jandaíra (RN):*

- Revisão de *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), com a descrição de novas espécies, Domínio da Caatinga, Brasil;
- Filogeografia do grilo *Endecous potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 (Orthoptera, Phalangopsidae): Investigação de linhagens crípticas em cavernas na Formação Jandaíra;
- Filogeografia de *Rowlandius potiguar* Santos, Ferreira & Buzzato, 2013 (Arachnida: Schizomida: Hubbardiidae) nas cavernas da Caatinga;
- Living in the subterranean time: Exploring biological rhythms in cave invertebrates;

#### *Formação Carajás (PA):*

- O meio subterrâneo superficial e a conectividade biológica no sistema ferrífero de Carajás;

A seguir, são apresentados, de forma resumida, os principais resultados obtidos em cada um dos referidos subprojetos. Maiores detalhes podem ser consultados nas publicações resultantes, que podem ser visualizadas nos links apresentados e também constam na íntegra como anexos deste relatório.

Ao final, serão discutidos também outros resultados obtidos e que não estão diretamente relacionados aos subprojetos acima.

### **3.1. Filogeografia de artrópodes troglóbios do oeste da Formação Jandaíra, Nordeste do Brasil: Evolução e conectividade biológica em ambientes subterrâneos como base para ações de conservação.**

Este subprojeto resultou na Tese de Doutorado de Diego de Medeiros Bento, analista ambiental do ICMBio/Cecav. Ela foi defendida e aprovada em junho de 2021, junto ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução, linha de pesquisa Padrões e Processos Evolutivos, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A tese está disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/44928>.

A Tese foi dividida em quatro capítulos. O primeiro e segundo foram unidos e resultaram em um artigo recém publicado no periódico internacional Biodiversity and Conservation. O terceiro capítulo foi apresentado como resumo expandido no 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia, e está sendo preparado para submissão como artigo a um periódico internacional. O quarto capítulo resultou na publicação da cartilha “Vida nas CaveRNas”, apresentada também como resumo expandido no 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia e distribuída nas redes públicas de ensino dos municípios de Felipe Guerra/RN e Baraúna/RN.

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados do subprojeto.

#### **3.1.1. Resumo geral**

Cavernas sempre despertaram a curiosidade dos cientistas em função dos troglóbios, organismos exclusivamente subterrâneos que frequentemente apresentam distribuição restrita e elevados níveis de endemismo. Eventos paleoclimáticos têm sido apontados como os principais responsáveis pela origem de espécies troglóbias, e o oeste da Formação Jandaíra, Nordeste do Brasil, alia a ocorrência de extensas áreas cársticas, enorme concentração de cavernas e aquíferos subterrâneos em uma região atualmente semiárida. Essa região é reconhecida pela riqueza e concentração de espécies troglóbias, algumas das quais (isópodes, anfípodes e hemípteros) possuem distribuição

relativamente ampla em áreas geológica e hidrologicamente distintas. Por meio de análises filogenéticas e filogeográficas, objetivamos avaliar os padrões de variação genética desses táxons, investigar possível diversidade críptica e delimitar Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's), bem como indicar os fatores que possivelmente influenciaram sua diversificação. Além disso, objetivamos avaliar o estado de conservação das linhagens e identificar áreas prioritárias para sua conservação. Com exceção de *Cirolanidae* sp.1 (Isopoda), os demais grupos apresentaram extensa diversidade de linhagens crípticas e, além da identificação de três UTO's para *Cirolanidae* sp.2 e cinco para *Potiberaba* (Amphipoda), *Kinnapotiguara troglobia* (Hemiptera) provavelmente é um complexo com sete espécies crípticas, com linhagens restritas às microbacias (táxons aquáticos) e lajedos (*Kinnapotiguara*). Somente uma pequena parcela das linhagens encontra-se em áreas protegidas, enquanto a maioria ocorre em áreas expostas a ameaças antrópicas e podem ser consideradas ameaçadas de extinção: *Cirolanidae* sp.1 foi categorizada como Vulnerável, enquanto *Cirolanidae* sp.2 possui uma linhagem Menos Preocupante (LC) e duas Criticamente Ameaçadas (CR). Para *Potiberaba*, há duas linhagens LC, uma Em Perigo (EN, *P. porakuara*) e duas CR, e, para *Kinnapotiguara*, há quatro linhagens EN e três CR (incluindo *K. troglobia*). Foram identificadas duas áreas prioritárias para conservação dessas linhagens, com destaque para a região da microbacia do riacho do Abreu e lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN, que abriga metade (oito, sendo seis endêmicas) das linhagens identificadas. O lajedo do Rosário, que pode ser considerado um sistema de cavernas e abriga 24 espécies troglóbias, é um hotspot de biodiversidade subterrânea. Por fim, apresentamos a cartilha "Vida nas CaveRNas", elaborada como uma estratégia educacional com o objetivo de despertar o interesse sobre as cavernas, seus habitantes e sua conservação.

### 3.1.2. Introdução geral

O meio subterrâneo compreende os espaços interconectados do subsolo, formados em rocha maciça e preenchidos por água ou ar (Juberthie 2000). As porções do ambiente subterrâneo acessíveis ao ser humano são chamadas de

cavernas, e têm como características gerais a ausência permanente de luz, tendência à temperatura constante e alta umidade nas regiões mais distantes das entradas (Culver 1982).

A ausência de luz impossibilita o desenvolvimento de organismos fotossintetizantes e produção primária, de forma que as teias tróficas subterrâneas são essencialmente dependentes de recursos alóctones (Ferreira et al., 2007). Embora possam abrigar uma fauna diversificada, as cavernas limitam o estabelecimento de inúmeras espécies e permitem a colonização apenas por organismos com pré-adaptações a tais características (Culver 1982, Gilbert & Deharveng 2002, Simon et al. 2007).

Os organismos cavernícolas podem usar o ambiente subterrâneo como abrigos diurnos ou noturnos (trogloxenos) e/ou completar seu ciclo de vida dentro ou fora de cavernas (troglófilos). Entretanto, algumas espécies são restritas ao ambiente hipógeo (troglóbios), geralmente apresentando especializações (e.g. morfológicas, fisiológicas, comportamentais) que se fixaram em função de pressões seletivas existentes nesses ambientes ou da ausência de pressões típicas de ambientes superficiais (Sket 2008, Culver & Pipan 2009). No entanto, tais adaptações podem levar também a uma perda na capacidade dispersiva, favorecendo o isolamento de linhagens e a especiação e, assim, os troglóbios frequentemente apresentam distribuição restrita e elevados níveis de endemismos, independente da escala de avaliação (Gilbert & Deharveng 2002, Mammola et al. 2015).

O Brasil possui mais de 21.000 cavernas cadastradas e o Rio Grande do Norte (RN) é atualmente o 4º Estado em quantidade de cavidades (1.284), cuja maioria está nos calcários do Grupo Apodi/Formação Jandaíra (CANIE/CECAV 2020). Com toda essa diversidade de ambientes subterrâneos, é de se esperar que a fauna, principalmente de invertebrados, também seja diversa. De fato, estudos têm apontado o oeste da Formação Jandaíra como uma das regiões mais relevantes do ponto de vista biospeleológico, com riqueza e diversidade comparáveis a outras regiões brasileiras, destacando-se pela quantidade de espécies troglóbias e estigóbias (como também são conhecidos os troglóbios

aquáticos) (Bento et al. 2021). Inclui-se aí os únicos relictos oceânicos atualmente conhecidos no país, que são organismos que evoluíram a partir de ancestrais marinhos "aprisionados" em espaços subterrâneos após eventos pretéritos de transgressão e posterior regressão oceânica (Ferreira et al. 2010, Fis̆er et al. 2013, Hoch & Ferreira 2013, Bento et al. 2016, Souza et al. 2018, Bento et al. 2021).

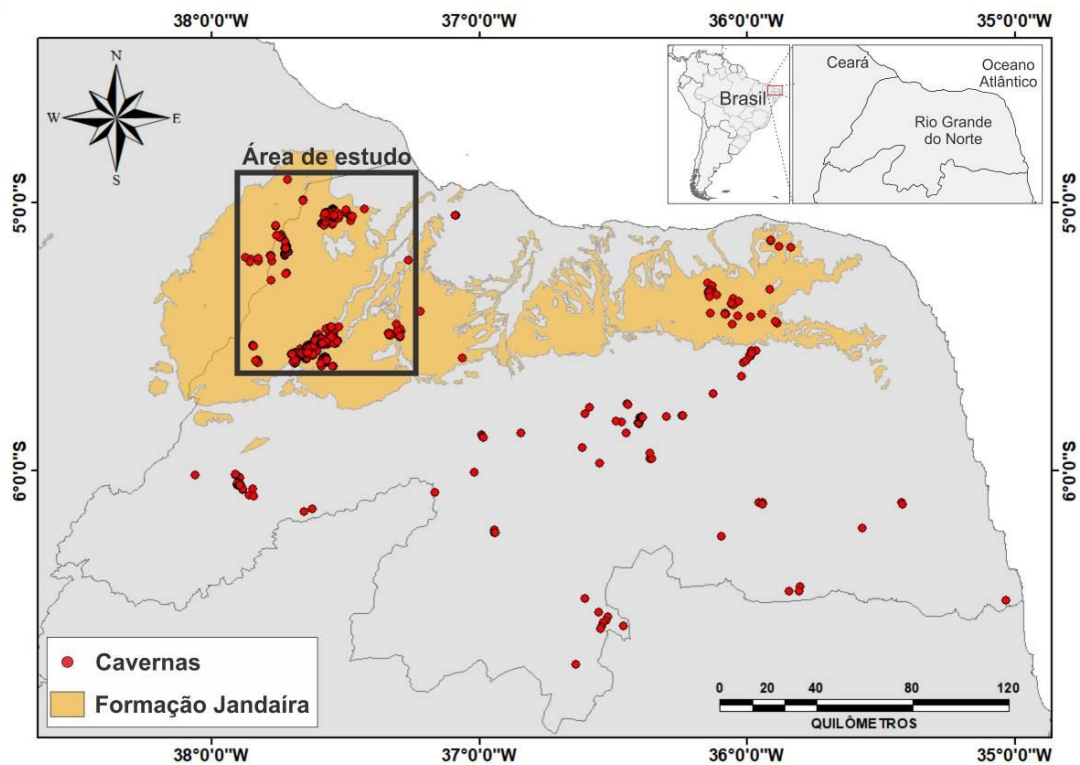


Figura 1. Distribuição das cavernas atualmente conhecidas nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com destaques para a formação Jandaíra e a área de estudo (oeste da formação Jandaíra).

Há o registro de 75 morfoespécies troglomórficas na formação Jandaíra (Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2016, Bento et al. 2021). Enquanto a maioria tem distribuição restrita, como observado para outras regiões do mundo (Holsinger 2000), quatro táxons têm ocorrência relativamente ampla (Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2016, Hoch & Ferreira 2013, Fis̆er et al. 2013, Bento et al. 2021): i) duas espécies de isópodes cirolanídeos, ainda não descritas, com ocorrência em diversas cavernas em uma área de mais de 1.400 km<sup>2</sup> (Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2016, Bento et al. 2021), incluindo quatro municípios dos estados do Rio Grande do Norte e Ceará; ii) o Anfípode *Potiberaba* Fis̆er, Zagmajster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Mesogammaridae), com ocorrência em diversas cavernas na mesma região dos cirolanídeos (Ferreira et al. 2010, Fis̆er et al. 2013, Bento et al.

2016, Bento et al. 2021); e iii) a cigarrinha troglóbia *K. troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 (Hemiptera: Kinnaridae), com ocorrência em várias cavernas em uma área de cerca de 50 km<sup>2</sup> nos municípios de Felipe Guerra/RN e Governador Dix-Sept Rosado/RN (Hoch & Ferreira 2013, Bento et al. 2016, Bento et al. 2021) (Figura 2).



Figura 2. Táxons troglóbios com ampla distribuição em cavernas na região Oeste da formação Jandaíra: duas espécies de isópodes cirolanídeos ainda não descritas (A e B), o anfípode *Potiberaba* sp. (C) e a cigarrinha *Kinnapotiguara* (D). As barras brancas no canto inferior direito em cada imagem correspondem a 1 mm.

A diversidade desses artrópodes troglóbios e sua distribuição relativamente ampla, em uma região atualmente semiárida marcada por mudanças paleoclimáticas (incluindo transgressões e regressões oceânicas) (Fisř et al. 2013, Rosseti et al. 2013, Souza et al. 2018), tornam-nos ótimos modelos para testar padrões evolutivos e de diversificação em ambientes subterrâneos aquáticos e terrestres na Caatinga. Nesse contexto, os avanços na geração e análise de dados moleculares têm contribuído para a compreensão dos padrões geográficos da biodiversidade (Niemiller et al. 2013).

Múltiplas espécies ou linhagens morfológicamente semelhantes e geneticamente distintas (muitas vezes classificadas como uma única espécie com ampla distribuição) foram descobertas nos últimos anos, e a diversidade críptica em organismos subterrâneos parece ser especialmente comum (Verovnik et al. 2003, Finston et al. 2007, Trontelj et al. 2009, Niemiller et al. 2013).

Os crustáceos cirolanídeos e anfípodes são considerados relictos oceânicos (Ferreira et al. 2010, Fišer et al. 2013) e ocorrem em áreas geológica e hidrologicamente distintas (Cruz et al. 2010, Bento et al. 2021). Os estigóbios geralmente apresentam maior capacidade de dispersão e distribuição ampla se comparados aos troglóbios terrestres, principalmente em função da possibilidade de conexão por meio de aquíferos subterrâneos (Culver et al. 2009). No entanto, vários estudos moleculares têm revelado que espécies estigóbias podem ser compostas por várias populações distribuídas de acordo com os limites hidrográficos em terrenos cársticos (Finston et al. 2007, Trontelj et al. 2009, Niemiller et al. 2013), e até mesmo consistir em complexos de espécies (Trontelj et al. 2009, Fišer et al. 2018).

No caso de *K. troglobia*, foram identificadas pequenas variações na morfologia genital masculina entre indivíduos de diferentes cavernas que podem ser indícios de especiação, e a ocorrência em cavernas de ambas as margens do rio Apodi-Mossoró pode representar uma barreira biogeográfica a ser testada (Hoch & Ferreira 2013). Da mesma forma, diferentes tributários desse rio também podem desempenhar papel de barreira à dispersão. Embora possivelmente exista conectividade no ambiente terrestre entre cavernas na região, que seria mantida por um sistema de micro e mesocavidades que possibilitaria o fluxo gênico entre as populações (Hoch & Ferreira 2013), é provável que isso ocorra apenas em escala local (Mammola et al. 2016, Pipan & Culver 2017).

A provável existência de linhagens crípticas tem implicações ainda para a conservação, pois elas têm distribuição geográfica mais restrita, sendo mais provável que todas as suas populações estejam simultaneamente ameaçadas (Bickford et al. 2007, Niemiller et al. 2013). Além disso, diferentes linhagens

crípticas podem ter níveis de ameaças variáveis, exigindo diferentes estratégias de conservação (Niemiller et al. 2013).

Assim, este estudo tem por objetivo analisar, por meio de uma abordagem filogeográfica, como as linhagens dos táxons-alvo estão distribuídas nas cavernas e nascentes cársticas no oeste da Formação Jandaíra. Consiste, ainda, na primeira análise filogeográfica molecular comparada com invertebrados troglóbios da Caatinga, e busca investigar os padrões de diversificação e os fatores que a influenciaram, contribuindo para a compreensão da história evolutiva não só dos táxons estudados, como também da própria área de estudo, além de contribuir para o manejo e conservação dessa fauna troglóbia endêmica.

### 3.1.3. Objetivos

#### *Objetivo geral*

Analisar, por meio de uma abordagem filogeográfica, como as linhagens dos táxons-alvo estão distribuídas nas cavernas e nascentes cársticas no oeste da Formação Jandaíra, esclarecendo os padrões e processos evolutivos envolvidos e gerando informações para a conservação das espécies e gestão do patrimônio espeleológico da região.

#### *Objetivos específicos*

- Delimitar e selecionar linhagens/populações dos táxons-alvo por meio de uma análise exploratória com utilização de códigos de barra de DNA (cox1);
- Determinar parâmetros populacionais, tempo de divergência e fluxo gênico entre linhagens de diferentes cavernas por meio de análises filogenéticas e filogeográficas;
- Avaliar a conectividade biológica subterrânea nos ambientes terrestre e aquático no oeste da Formação Jandaíra;
- Gerar informações moleculares para complementar a descrição morfológica de espécies novas, bem como subsidiar alguma revisão taxonômica necessária;

- Delimitar as espécies e populações dos táxons troglóbios de interesse e, junto com informações sobre padrões de conectividade biológica e grau de endemismo, gerar conhecimento aplicável à conservação e gestão do patrimônio espeleológico da região, por meio de subsídios à avaliação do status de conservação (segundo critérios da IUCN) e da definição de áreas prioritárias para ações de conservação.

- Produzir um material didático, na forma de cartilha, visando despertar o interesse sobre as cavernas, seus habitantes e sua conservação.

#### 3.1.4. Hipóteses e predições

##### *Hipótese geral*

Há padrões genéticos distintos entre os táxons-alvo em função do nível de conectividade do ambiente subterrâneo (disponibilidade de habitat) e do potencial de dispersão de cada grupo (Figura 3).

##### *Predições*

- As divergências mais profundas correspondem a eventos estimados do final do Mioceno: a última regressão oceânica de grandes proporções para os grupos aquáticos (relictos oceânicos), e o surgimento do rio Apodi-Mossoró para *K. troglobia*;

- Há diversas linhagens crípticas, endêmicas e evolutivamente distintas, distribuídas de acordo com os padrões de drenagem para os táxons aquáticos (com distribuição mais ampla em função da possibilidade de dispersão via aquíferos subterrâneos, se comparada ao ambiente terrestre) e de acordo com os afloramentos calcários para *K. troglobia*.

- Tais linhagens estão diferencialmente expostas a ameaças antrópicas, com diferentes riscos de extinção em relação aos táxons nominais dos quais fazem parte.

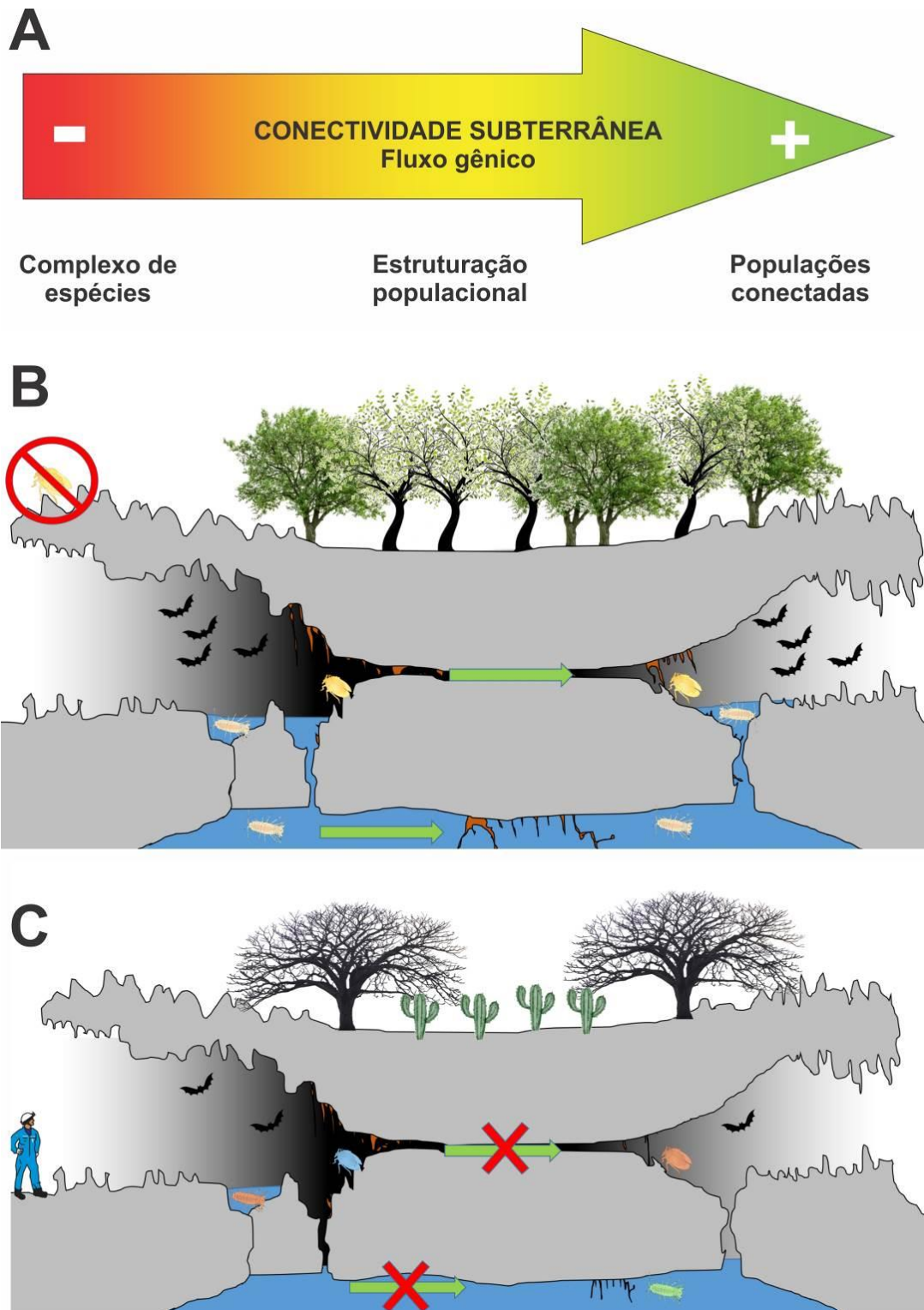


Figura 3. Padrões genéticos distintos esperados em função da existência ou não de conectividade biológica subterrânea. (A) São possíveis desde complexos de espécies (ausência de fluxo gênico por longo período) a populações conectadas de uma mesma espécie (fluxo gênico existente), passando por populações estruturadas em uma situação intermediária; (B) representação de possível cenário paleoambiental da área de estudo, com provável conectividade biológica existente nos ambientes subterrâneos aquático e terrestre; (C) representação do cenário atual na área de estudo, com provável interrupção do fluxo gênico levando a populações estruturadas ou complexo de espécies dependendo do tempo de isolamento.

3.1.5. Artigo: Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid








O artigo resultou da junção do primeiro e segundo capítulos da Tese, sendo recentemente aceito e publicado na prestigiada revista Biodiversity and Conservation (Figura 4). O artigo original, incluindo o material suplementar, pode ser acessado em <https://doi.org/10.1007/s10531-024-02833-w>, e consta também nos anexos a este relatório.

Biodiversity and Conservation  
<https://doi.org/10.1007/s10531-024-02833-w>

ORIGINAL RESEARCH



## Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid

Diego de Medeiros Bento<sup>1,2</sup>  · Rodrigo Lopes Ferreira<sup>3,4</sup>  ·  
Santelmo Vasconcelos<sup>5,6</sup>  · Jamily Lorena Ramos de Lima<sup>5</sup>  ·  
Guilherme Oliveira<sup>5</sup>  · Tiago Castro Silva<sup>1</sup>  · Sergio Maia Queiroz Lima<sup>2,7</sup> 

Received: 6 November 2023 / Revised: 19 March 2024 / Accepted: 20 March 2024  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Figura 4. Artigo resultante da junção do primeiro e segundo capítulos da Tese, publicado recentemente no periódico internacional Biodiversity and Conservation.

A seguir, apresentamos o resumo traduzido e os principais destaques do artigo.

### *Resumo traduzido*

Um dos passos mais importantes na identificação de áreas prioritárias para conservação é a avaliação da riqueza de espécies e seus riscos de extinção. Embora a maioria das espécies permaneça não descrita, a identificação de linhagens crípticas é frequente em estudos filogenéticos e filogeográficos. Isso é particularmente comum em troglóbios, organismos exclusivamente subterrâneos. A Formação Jandaíra, no semiárido brasileiro, combina a ocorrência de extensas áreas cársticas com centenas de cavernas e aquíferos



subterrâneos em uma região com intensas mudanças paleoclimáticas. Esta região é reconhecida pela riqueza de espécies troglóbias, algumas das quais são amplamente distribuídas em áreas heterogêneas. Isso sugere linhagens crípticas que podem ser diferencialmente expostas a ameaças antropogênicas, com riscos de extinção distintos em relação aos táxons nominais aos quais supostamente pertencem. Para testar isso, uma grande amostragem foi conduzida e, por meio de análises de delimitação de linhagens, a estrutura genética de quatro táxons troglóbios, três aquáticos e um terrestre, foi avaliada. Além disso, o risco de extinção dessas linhagens foi avaliado e áreas prioritárias para conservação foram identificadas. Os resultados indicaram que, enquanto *Cirolanidae* sp. 1 (Isopoda) é uma única espécie amplamente distribuída, *Cirolanidae* sp. 2, *Potiberaba porakuara* (Amphipoda) e *Kinnapotiguara troglobia* (Hemiptera) apresentam uma extensa diversidade de linhagens crípticas e endêmicas, a maioria das quais são provavelmente novas espécies ameaçadas. Além disso, duas áreas prioritárias para a conservação dessas linhagens foram identificadas. Assim, a filogeografia comparada pode representar um primeiro passo na conservação de táxons subterrâneos, indicando áreas que devem ser priorizadas em um contexto de ameaças crescentes e recursos de conservação cada vez mais escassos.

### *Objetivos*

Usando análises filogenéticas e filogeográficas, integradas com ferramentas de planejamento sistemático de conservação (SCP), os objetivos foram: (i) avaliar os padrões de variação genética dos táxons alvo, investigando sua potencial diversidade críptica e delimitando Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs); (ii) verificar ameaças e riscos de extinção desses táxons; (iii) aplicar o método de categorias e critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 2022) para cada OTU; e (iv) identificar áreas prioritárias para a conservação dessas linhagens crípticas, a fim de indicar estratégias de conservação, mesmo antes de sua descrição formal.

### *Destaques e resultados*

- Este é o primeiro estudo de filogeografia molecular comparada focado em invertebrados troglóbios do bioma Caatinga. A ampla amostragem, que

inclui toda a distribuição geográfica conhecida dos táxons alvo, permitiu a investigação de padrões de diversificação e os fatores que a influenciaram. Assim, este estudo contribui não só para o entendimento da evolução, mas também para a conservação desta fauna troglóbia endêmica do semiárido brasileiro.

- O estudo envolveu 31 cavernas e nascentes cársticas na Formação Jandaíra, localizadas em regiões geológica e hidrologicamente distintas em diversos municípios nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, Bioma Caatinga, Nordeste do Brasil (Tabela 1, Figura 5).

- Análises baseadas em sequências parciais do gene *cox1* com 593 pares de bases (pb) de 67 indivíduos de *Cirolanidae* sp.1 coletados em nove cavernas, 18 indivíduos de *Cirolanidae* sp.2 de três cavernas; sequências de 588 pb de 64 indivíduos de *Potiberaba porakuara* coletados em nove cavernas e duas nascentes cársticas; sequências de 659 pb de 126 indivíduos de *Kinnapotiguara troglobia* coletados em 20 cavernas (Tabela 1, Figura 5).

- Análises filogenéticas (máxima verossimilhança e bayesianas), complementadas por diversos métodos de delimitação de linhagens (ABGD, sGMYC, mGMYC, bPTP e BAPS), redes de haplótipos e cálculos de distâncias genéticas basearam a delimitação das linhagens e espécies crípticas nos táxons alvo.

- Tais análises apontam que *Cirolanidae* sp.1 é uma única espécie com distribuição relativamente ampla, possível provavelmente devido à conectividade hidrológica subterrânea e a uma maior capacidade de dispersão (Figura 6). Apesar disso, a espécie ocorre em áreas em sua maior parte impactadas por atividades antrópicas e poderia ser classificada como ameaçada de extinção, na categoria Vulnerável (Figura 6).

- Situação diferente foi encontrada para *Cirolanidae* sp.2, com a identificação de três possíveis espécies crípticas, cada uma restrita a uma única caverna e com riscos de extinção distintos em relação ao táxon original (Figura 6).

Tabela 1. Dados das cavernas e nascentes com espécies troglóbias na Formação Jandaíra, Nordeste do Brasil. A primeira coluna (ID) indica os números pelos quais as localidades são identificadas na Figura 4. \* - Parque Nacional Furna Feia; ● - registrado pela primeira vez neste estudo. Ameaças: D – desmatamento, A – agricultura, IM - mineração irregular, OE - exploração de petróleo, L – pecuária, DV - visitação desordenada, GL - rebaixamento do nível do lençol freático, ANM - polígonos de direitos de mineração em estágio avançado, RRM - direito de solicitar mineração, MR - requerimento de mineração, MC - concessão de mineração.

ID	Locality	Code	Municipality/state	Coordinates (SIRGAS 2000)		Hydrography		Limestone outcrop	Occurrence and number of sequenced individuals				Habitat	Threats	
				Latitude (S)	Longitude (W)	Basin	Microbasin		Cirolanidae sp.1	Cirolanidae sp. 2	Potiberaba porakuara.	Kinnapotiguara troglobia		Current	Potential
01	Furna Nova cave*	FNV	Baraúna/RN	05° 02' 03,21"	37° 34' 16,04"	Coastal microbasins	Mata stream	Furna Nova	7*				Subterranean stream (phreatic)	-	-
02	Lago cave*	LGO	Baraúna/RN	05° 02' 11,40"	37° 34' 15,24"	Coastal microbasins	Mata stream	Furna Nova	5				Subterranean stream and lakes (phreatic)	-	-
03	Furna Feia cave*	FFA	Baraúna/RN	05° 02' 12,76"	37° 33' 36,64"	Coastal microbasins	Mata stream	Furna Feia			11*		Subterranean stream (phreatic)	-	-
04	Pedra Lisa cave*	PDL	Baraúna/RN	05° 02' 43,84"	37° 31' 18,85"	Coastal microbasins	Virgínio stream	Pedra Lisa	10*	5*	5*		Subterranean stream (phreatic)	-	-
05	Olho d'Água do Cedro cave	ODC	Quixeré/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	Apodi-Mossoró river	Bom Sucesso stream	Cedro	2*		3*		Subterranean lake (phreatic)	D, A	ANM (MC)
06	Aposta cave	APO	Quixeré/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	Apodi-Mossoró river	Bom Sucesso stream	Lajedo Grande	2*				Subterranean lake (phreatic)	D, IM	ANM (MR)
07	Olho d'Água da Onça karstic spring	ODO	Mossoró/RN	05° 28' 34,18"	37° 16' 48,73"	Apodi-Mossoró river	Carmo river	Olho d'Água da Onça			5*		Karstic spring	D, L	ANM (MR)
08	Olho d'Água da Furna cave	ODF	GDS Rosado/RN	05° 28' 50,55"	37° 32' 29,94"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Gangorrinha			7*		Resurgence (phreatic)	D, IM, DV	ANM (MC)
09	Boca de Peixe cave	BPX	GDS Rosado/RN	05° 29' 04,56"	37° 33' 29,69"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Bonito				8	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (MR)
10	Poço Feio cave	PFE	GDS Rosado/RN	05° 29' 15,51"	37° 33' 33,40"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Bonito			4	8*	Subterranean stream and resurgence (phreatic); terrestrial, with roots	D, IM, DV	ANM (MR)
11	Marimbondo Caboclo/Água cave	CAG	GDS Rosado/RN	05° 29' 43,56"	37° 32' 43,46"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Angicos	12		1		Subterranean lake (phreatic)	D, IM	ANM (MC)
12	SN9 cave	SN9	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,33"	37° 32' 41,71"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Angicos				1*	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (MC)
13	Sombra de Ubaia cave	SUB	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,64"	37° 32' 41,23"	Apodi-Mossoró river	Cote stream	Angicos				1*	Terrestrial, with roots	D, MI	ANM (MC)
14	Bota cave	BOT	Felipe Guerra/RN	05° 31' 30,85"	37° 37' 05,29"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Arapuá				7	Terrestrial, with roots	D, IM, OE	ANM (MR)
15	Arapuá cave	ARA	Felipe Guerra/RN	05° 31' 48,25"	37° 36' 58,48"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Arapuá				9	Terrestrial, with roots	D, IM, OE	ANM (MR)
16	Seta cave	SET	Felipe Guerra/RN	05° 32' 40,23"	37° 38' 03,10"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Arapuá				7	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (MC)
17	Rumana cave	RUM	Felipe Guerra/RN	05° 33' 54,12"	37° 39' 07,23"	Apodi-Mossoró river	Saco stream	Rumana				10	Terrestrial, with roots	D, A	-
18	Buraco Redondo cave	BRD	Felipe Guerra/RN	05° 34' 42,98"	37° 39' 04,99"	Apodi-Mossoró river	Saco stream	Meio				9	Terrestrial, with roots	D, IM	-
19	Troglóbios cave	TRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 24,27"	37° 39' 40,57"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Rosário	11		5	12	Subterranean lake (phreatic); terrestrial, with roots	-	-
20	Crotes cave	CRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 37,92"	37° 39' 30,89"	Apodi-Mossoró river	Epikarstic drainage / Arapuá stream	Rosário		9	2	6	Subterranean lake (epikarstic); terrestrial, with roots	D, A	DV
21	Descoberta cave	DBT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 47,50"	37° 39' 55,77"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Rosário				9	Terrestrial, with roots	D, A	-
22	Olho d'Água do Tetéu karstic spring	ODT	Felipe Guerra/RN	05° 34' 02,63"	37° 40' 13,88"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Tetéu			4*		Karstic spring	D, A	-
23	Dois cave	CDS	Felipe Guerra/RN	05° 34' 06,51"	37° 40' 50,42"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Alfredo				7*	Terrestrial, with roots	D	-

24	Duas Urtigas cave	URT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,48"	37° 41' 00,01"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa				2*	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
25	Raposa cave	RAP	Felipe Guerra/RN	05° 33' 36,15"	37° 41' 03,77"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa				2*	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
26	Lapa I cave	LAI	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,50"	37° 41' 18,31"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa				8*	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
27	Lapa I/Engano cave	LIE	Felipe Guerra/RN	05° 33' 41,89"	37° 41' 42,25"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa				6	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
28	Mosteiro cave	MOS	Felipe Guerra/RN	05° 33' 45,61"	37° 41' 44,19"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa				6*	Terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
29	Boa cave	CBO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 59,50"	37° 41' 52,43"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Lapa	9*		3*	2*	Subterranean stream and lake (phreatic); terrestrial, with roots	D, IM	ANM (RRM)
30	Três Lagos cave	TLG	Felipe Guerra/RN	05° 35' 34,40"	37° 41' 12,70"	Apodi-Mossoró river	Abreu stream	Brejo	9	4	14		Subterranean lake and resurgence (phreatic)	DV, A, GL	ANM (RRM)
31	Dos Que Já Foram cave	QJF	Felipe Guerra/RN	05° 32' 47,68"	37° 39' 59,78"	Apodi-Mossoró river	Arapuá stream	Toco				6*	Terrestrial, with roots	D, IM	-
Total									67	18	64	126			

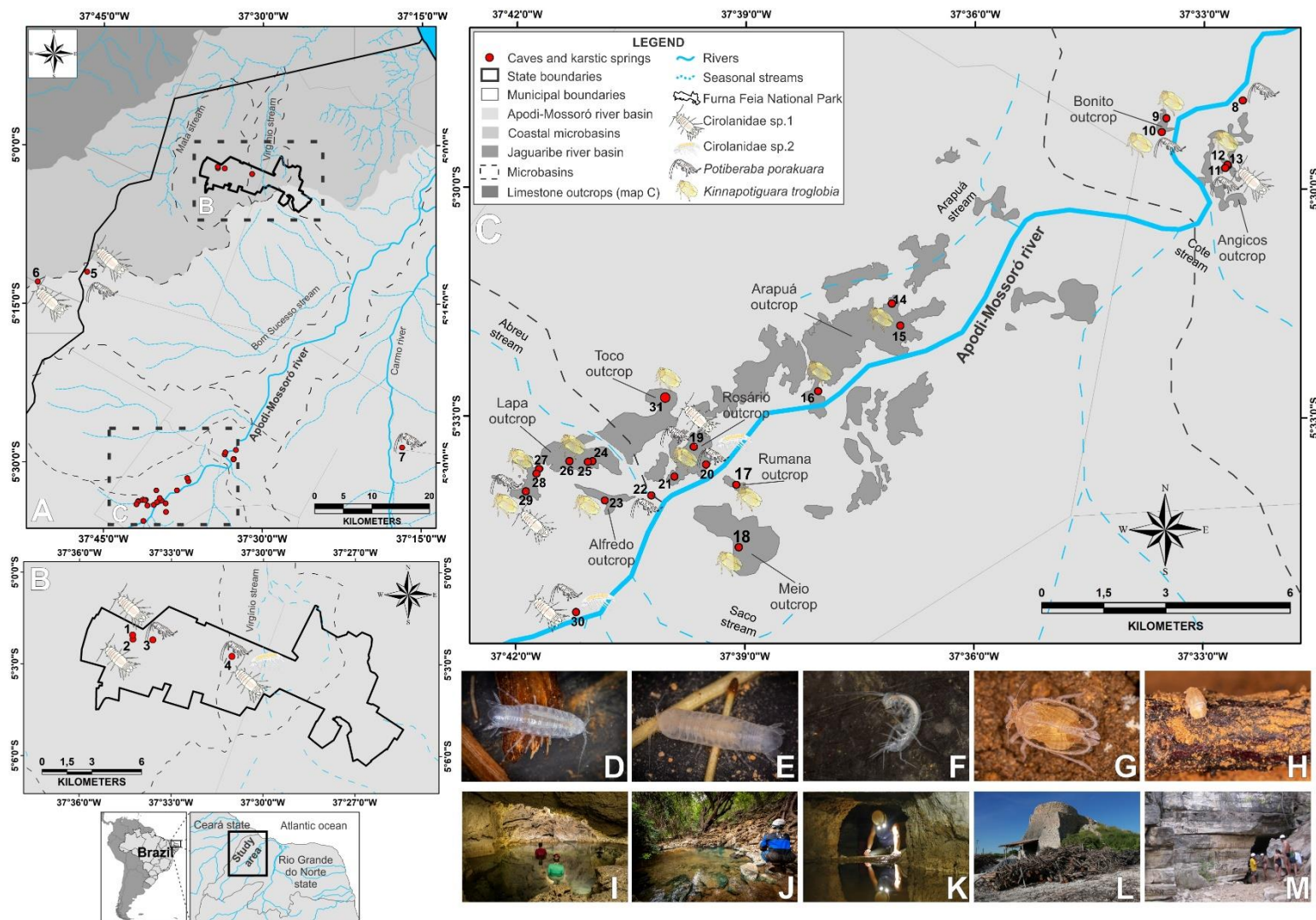


Figura 5. Visão geral da área de estudo (A), com detalhe das áreas com localidades no Parque Nacional Furna Feia (B) e nos municípios de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado (C) com ocorrência de táxons alvo, *Cirolanidae* sp. 1 (D), *Cirolanidae* sp. 2 (E), *Potiberaba porakuara* (F) e *Kinnapotiguara troglobia* (G). Há também alguns ambientes subterrâneos terrestres (H, é possível ver uma ninfa de *K. troglobia* em uma raiz na caverna do Arapuá) e aquáticos (I, lago freático na Caverna Três Lagos; J, nascente cárstica Olho d'Água do Tetéu; K, lago epikárstico na Caverna Crotes), bem como alguns impactos antrópicos (L, forno de cal perto da caverna Olho d'Água da Furna - é possível observar uma grande quantidade de lenha, resultado do desmatamento, usada como combustível na queima de calcário; M, visitaçao desordenada na caverna Poço Feio). Números de localidades de acordo com a coluna ID da Tabela 1.

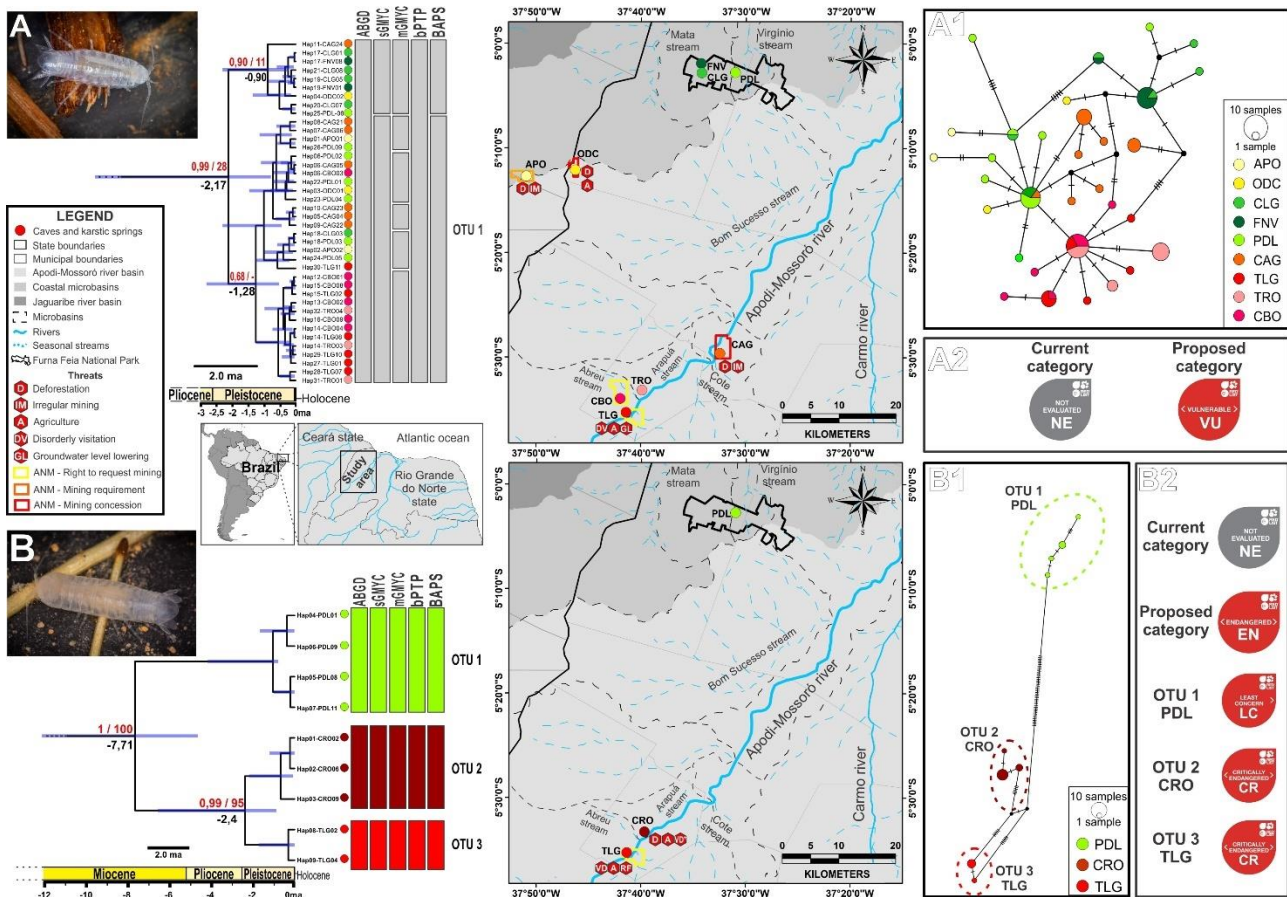


Figura 6. Árvores filogenéticas com estimativas de tempo de divergência resultantes da Inferência Bayesiana, além dos resultados dos métodos de delimitação de linhagens e localização das cavernas e nascentes cársticas (com indicação de ameaças antrópicas) com ocorrência de Cirolanidae sp. 1 (A) e Cirolanidae sp. 2 (B). As redes de haplótipos (A1 e B1) e a categorização do risco de extinção dos táxons e OTUs (A2 e B2) também são apresentadas. Em cada nó nas árvores são mostradas as probabilidades posteriores (acima à esquerda), os valores de bootstrap (resultantes das reconstruções filogenéticas de máxima verossimilhança, acima à direita), e a idade média estimada (abaixo). As barras roxas representam os intervalos de 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação gráfica, os grupos externos foram removidos da filogenia.

- Para *P. porakuara*, foram delimitadas cinco possíveis espécies crípticas (Figura 7), a maioria restrita a uma única caverna ou nascente cárstica e com riscos de extinção distintos em relação ao táxon original (Figura 7). A distribuição dessas linhagens é coerente com a distribuição das cavernas nas diferentes microbacias hidrográficas da região, indicando um possível papel das drenagens na dispersão.

- Importante frisar que a separação das linhagens mais antigas de *P. porakuara* e Cirolanidae sp.2 ocorreram no final do Mioceno (Figuras 6 e 7), o que é concordante com as estimativas para o último evento regional de regressão oceânica e reforça o status de relictos oceânicos dos grupos.

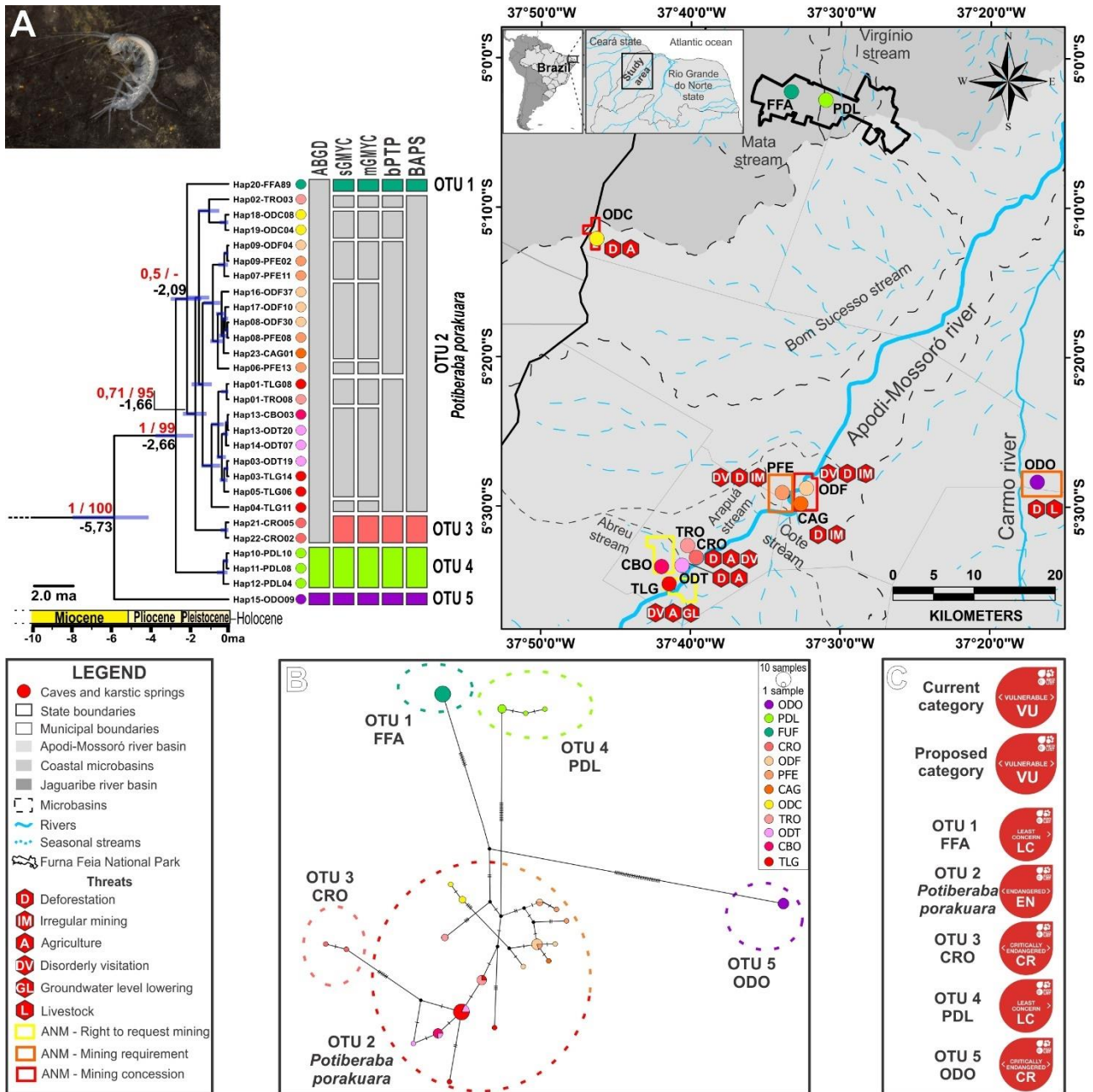


Figura 7. Árvores filogenéticas com estimativas de tempo de divergência resultantes da Inferência Bayesiana, além dos resultados dos métodos de delimitação de linhagens e localização das cavernas e nascentes cársticas (com indicação de ameaças antrópicas) com ocorrência de *Potiberaba porakuara* (A). A rede de haplótipos (B) e a categorização atual e proposta do risco de extinção do táxon e OTUs (C) também são apresentadas. Em cada nó nas árvores são mostradas as probabilidades posteriores (acima à esquerda), os valores de bootstrap (resultantes das reconstruções filogenéticas de máxima verossimilhança, acima à direita), e a idade média estimada (abaixo). As barras roxas representam os intervalos de 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação gráfica, os grupos externos foram removidos da filogenia.

- Para *K. troglobia*, foram delimitadas oito possíveis espécies crípticas (Figura 8), a maioria restrita a um único afloramento calcário e com riscos de extinção distintos em relação ao táxon original (Figura 8). A distribuição dessas

linhagens é coerente com a distribuição das cavernas nos diferentes afloramentos calcários, indicando a possibilidade de dispersão de indivíduos entre cavernas de um mesmo lajedado.

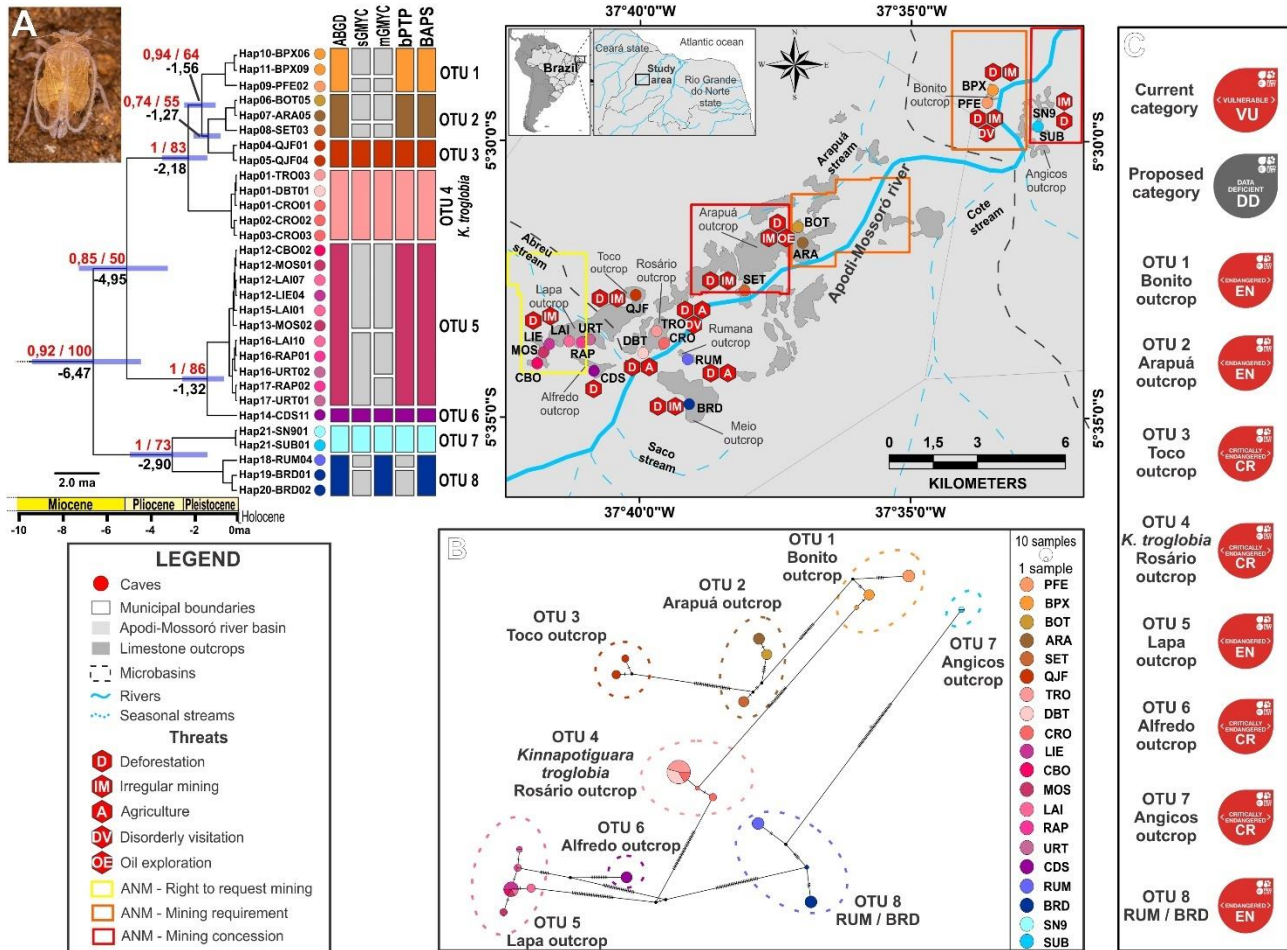


Figura 8. Árvores filogenéticas com estimativas de tempo de divergência resultantes da Inferência Bayesiana, além dos resultados dos métodos de delimitação de linhagens e localização das cavernas (com indicação de ameaças antrópicas) com ocorrência de *Kinnapotiguara troglobia* (A). A rede de haplótipos (B) e a categorização atual e proposta do risco de extinção do táxon e OTUs (C) também são apresentadas. Em cada nó nas árvores são mostradas as probabilidades posteriores (acima à esquerda), os valores de bootstrap (resultantes das reconstruções filogenéticas de máxima verossimilhança, acima à direita), e a idade média estimada (abaixo). As barras roxas representam os intervalos de 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação gráfica, os grupos externos foram removidos da filogenia.

- Tais resultados foram corroborados pelas análises de variância molecular (AMOVA), pois a distribuição das cavernas e nascentes cársticas nas diferentes microbacias foi a variável que melhor explicou a variabilidade genética em Cirolanidae e *P. porakuara*. Da mesma forma, a distribuição das cavernas nos diferentes afloramentos calcários foi a variável que melhor explicou a variabilidade genética em *K. troglobia*.

- A Formação Jandaíra vem passando por um processo de exumação tardia desde o Mioceno, resultando em intensos processos de carstificação que deram origem às cavernas. A origem e expansão desses habitats subterrâneos ocorreram durante a alternância entre períodos secos e úmidos (glaciais e interglaciais), contribuindo para a expansão das condições semiáridas e a dispersão e diversificação de organismos adaptados à Caatinga. Portanto, a combinação de habitats subterrâneos abundantes e condições externas desafiadoras provavelmente desempenhou um papel crucial na diversificação desses artrópodes troglóbios.

- As análises espaciais de variância molecular (SAMOVA) indicaram os melhores cenários de delimitação de populações e possibilitaram os cálculos de diversidade genética populacionais. Isso, junto com a avaliação das ameaças antrópicas, possibilitaram as avaliações do risco de extinção com base na metodologia da IUCN (internacionalmente aceita e utilizada no Brasil para a definição das espécies oficialmente ameaçadas de extinção).

- O software Zonation foi utilizado para, a partir de uma metodologia desenvolvida no artigo, definir as áreas prioritárias para a conservação da diversidade genética dos grupos alvo na área de estudo (Figura 9).

- A região de Felipe Guerra (RN), particularmente o lajedo do Rosário, abriga uma parte considerável da variabilidade genética dos táxons estudados. Ela abriga cinco OTUs, incluindo três espécies endêmicas e CR, juntamente com duas populações de outras linhagens com menor risco de extinção. Os esforços de conservação também devem ser direcionados para áreas próximas à microbacia do Riacho Abreu, que abriga mais da metade dos OTUs identificadas (10, oito endêmicas) em uma pequena região de 15 quilômetros quadrados. A segunda área prioritária inclui localidades na microbacia do Riacho do Cote. Esta região enfrenta ameaças significativas, como mineração irregular, desmatamento ligado à produção de cal e visitação desordenada.

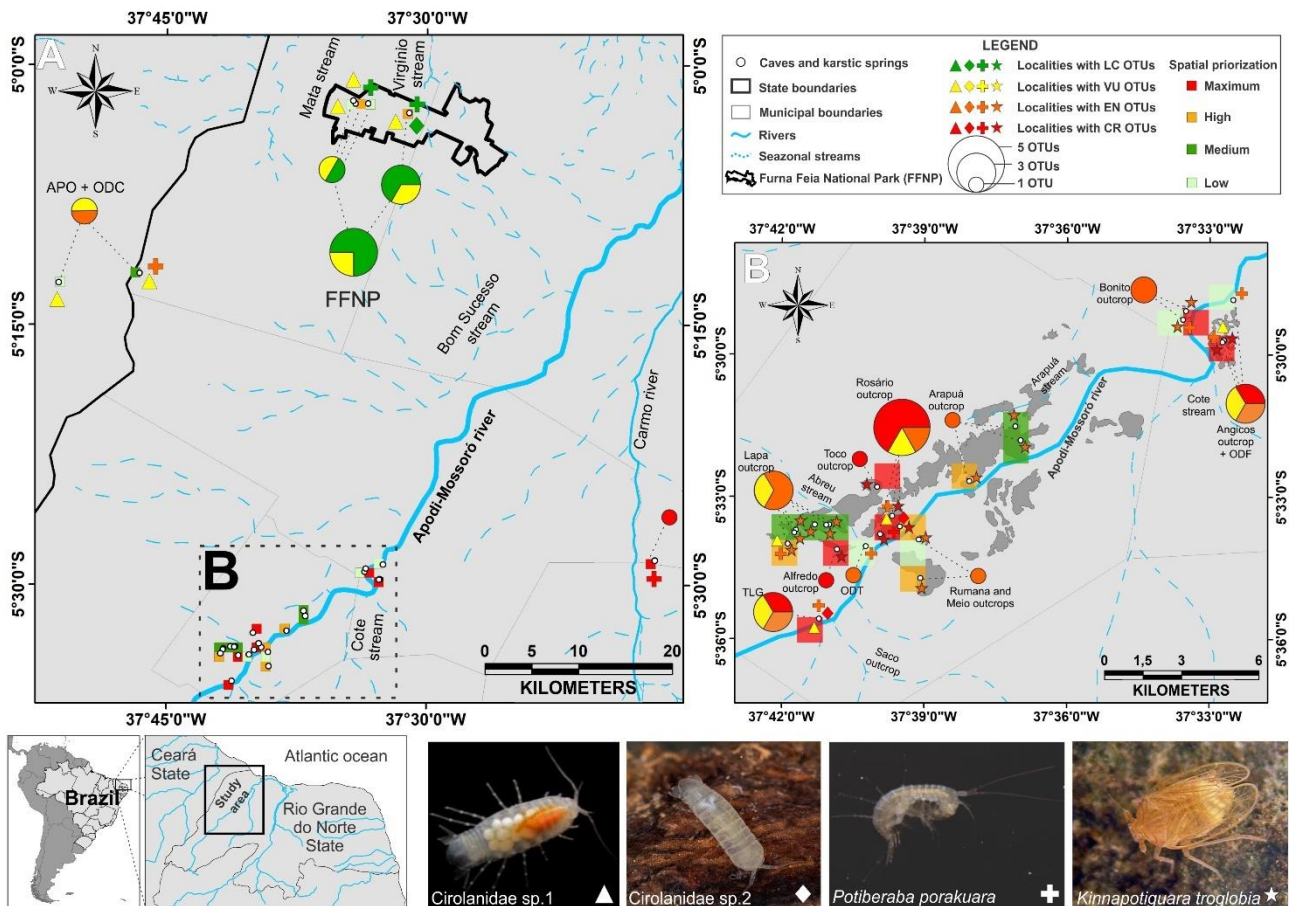


Figura 9. Áreas prioritárias para a conservação de espécies crípticas e ameaçadas de artrópodes troglóbios no semiárido brasileiro. Os gráficos de pizza têm um diâmetro proporcional à quantidade de OTUs em diferentes microbacias e afloramentos calcários, indicando também a quantidade de linhagens em cada categoria de ameaça - Criticamente em Perigo (CR, vermelho), Em Perigo (EN, laranja), Vulnerável (VU, amarelo) e Menos Preocupante (LC, verde).

- Diante desses resultados, é necessária uma discussão sobre as restrições para a avaliação do risco de extinção, muitas vezes focada apenas em espécies formalmente descritas, apesar da metodologia da IUCN poder ser aplicada a qualquer unidade taxonômica no nível da espécie ou abaixo. Subespécies, subpopulações ou formas que ainda não estão totalmente descritas podem ser avaliadas se houver um claro benefício para a conservação. Estudos recentes apontaram que espécies de vertebrados não descritas têm maior risco de extinção do que espécies conhecidas, e isso deve ser ainda mais preocupante para os invertebrados. Nesse contexto, uma possível avaliação do status de conservação de OTUs delimitados a partir de dados moleculares permitiria a adoção de ações de conservação e minimizaria os impactos negativos do impedimento taxonômico na conservação desses táxons.

## *Conclusões*

Ambientes subterrâneos são frequentemente negligenciados nos esforços de conservação, embora abriguem formas de vida extraordinárias com adaptações únicas. Esses habitats prestam serviços ecossistêmicos essenciais e representam uma fronteira para a exploração científica (Mammola et al. 2019).

Embora mesmo habitats subterrâneos acessíveis, como as cavernas, sejam desafiadores e requeiram técnicas especializadas para a pesquisa (Ficetola et al. 2019), existe uma rede subterrânea ainda maior, em grande parte inacessível, que pode ser o habitat principal para muitas espécies (Howarth 1983). A extensão total deste mundo subterrâneo permanece em grande parte desconhecida. Diante desses desafios e incertezas, medidas práticas para proteger ambientes subterrâneos precisam ser consideradas (Mammola et al. 2019). Assim, a filogeografia comparada pode revelar padrões de distribuição e fatores que os influenciam, destacando a conectividade subterrânea e áreas além das cavernas que precisam ser priorizadas em ações de conservação.

Dados moleculares nem sempre estão disponíveis para todas as espécies no planejamento da conservação, e podem ser limitados pelo uso de marcadores menos informativos, como o DNA mitocondrial (Nielsen et al. 2023), como neste estudo. Embora esses dados sejam cruciais para o planejamento eficaz da conservação, esperar por mais dados pode levar a piores resultados para a biodiversidade quando a ação imediata é necessária (Grantham et al. 2009, Liu et al. 2022). Isso é ainda mais válido ao considerar que a integração geral de dados moleculares no planejamento da conservação permanece semelhante ao usar técnicas de sequenciamento mais antigas ou mais recentes (Nielsen et al. 2023).

Essas abordagens podem representar um primeiro passo para salvaguardar ambientes subterrâneos, destacando áreas e táxons que devem ser priorizados. Isso é especialmente crucial em um contexto de recursos cada vez mais escassos para a conservação, especialmente no Brasil, onde as cavernas enfrentam ameaças sem precedentes (Ferreira et al. 2022).

3.1.6. Um novo hotspot de biodiversidade subterrânea no Nordeste brasileiro

Trata-se do terceiro capítulo da Tese, que também foi apresentado como resumo expandido no 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia (Figura 10) e está sendo preparado para submissão como artigo a um periódico internacional. Os originais podem ser acessados em [http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe\\_560-575.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_560-575.pdf) (resumo expandido) e <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/44928> (Tese), e constam também nos anexos a este relatório.



**35<sup>o</sup>** ANAIS do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia  
Bonito - MS | 19 - 22 de julho de 2019 - ISSN 2178-2113 (online)

O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br).

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

BENTO, D.M. et al. Um oásis no semiárido nordestino: o Lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN, como um novo hotspot de biodiversidade subterrânea. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 35, 2019. Bonito. *Anais...* Campinas: SBE, 2019. p.560-575. Disponível em: [http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe\\_560-575.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_560-575.pdf). Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia. Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)



**ANAIS do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia**  
Bonito/MS, 19-22 de junho de 2019 – Sociedade Brasileira de Espeleologia

**UM OÁSIS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO: O LAJEDO DO ROSÁRIO, EM FELIPE GUERRA/RN, COMO UM NOVO HOTSPOT DE BIODIVERSIDADE SUBTERRÂNEA**

*AN OASIS IN THE NORTHEAST OF BRAZIL: THE ROSARIO OUTCROP, IN FELIPE GUERRA/RN, AS A NEW UNDERGROUND BIODIVERSITY HOTSPOT*

**Diego de Medeiros BENTO (1, 2); Sérgio Maia Queiroz LIMA (2); Marconi SOUZA-SILVA (3); Rodrigo Lopes FERREIRA (3)**

(1) Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas – CECav/ICMBio.  
(2) Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução – UFRN.  
(3) Centro de Estudos em Biologia Subterrânea – CEBS/UFLA.

Figura 10. Resumo expandido apresentado no 35º Congresso Nacional de Espeleologia, em 2019, e publicado nos anais do evento.

A seguir, apresentamos o resumo e os principais destaques do trabalho.

## Resumo

Cavernas são geralmente caracterizadas como ambientes oligotróficos, extremos e considerados incapazes de abrigar uma fauna diversificada. No entanto, sabe-se atualmente que áreas cársticas podem exibir uma considerável diversidade subterrânea. Atualmente são reconhecidos 38 hotspots de biodiversidade subterrânea, somente dois dos quais na América do Sul. O oeste do Rio Grande do Norte se destaca pela riqueza de troglóbios, com grande concentração em um único afloramento calcário, o lajedo do Rosário, no município de Felipe Guerra. A distribuição de alguns troglóbios em diferentes cavernas no afloramento, particularmente da cigarrinha *Kinnapotiguara troglobia*, pode indicar conectividade biológica e continuidade do habitat subterrâneo. Este estudo objetiva apresentar a diversidade da fauna troglóbica do lajedo do Rosário e, com base na distribuição de *K. troglobia* e utilizando análises filogeográficas, testar a hipótese de que esse afloramento é um habitat subterrâneo contínuo formado por um sistema interconectado de cavernas e, assim sendo, um hotspot de biodiversidade subterrânea em função do número de espécies troglóbicas que o sistema possui. Foram registradas 24 espécies troglóbicas em nove cavernas no afloramento. Sequências parciais do gene mitocondrial *cox1* foram obtidas de 120 indivíduos de *K. troglobia* de 19 cavernas, sendo identificados 19 haplótipos divergentes e geralmente exclusivos de cada caverna, com poucas exceções que incluem um haplótipo compartilhado entre três cavernas no lajedo do Rosário. Os valores de  $\Phi_{ST}$  apontam fluxo gênico restrito ou inexistente entre populações de diferentes cavernas, com poucas exceções que incluem o lajedo do Rosário. Testes de variância molecular e de delimitação de populações indicaram que a variação genética é explicada pela distribuição das cavernas nos lajedos, e os resultados indicam fluxo gênico de *K. troglobia* entre cavernas no lajedo do Rosário, o que demonstra a existência de um sistema interconectado de cavernas nessa formação. A conectividade biológica subterrânea entre as cavernas que compõem o sistema do Rosário, evidenciada pelo padrão filogeográfico contrastante encontrado entre esse lajedo e a maioria das demais localidades de *K. troglobia*, comprova que o lajedo do Rosário pode ser considerado um hotspot de biodiversidade subterrânea, já

que as espécies troglóbias ali encontradas ocorrem em um sistema de cavernas interconectadas. Tais resultados, aliados à crescente pressão em função de atividades antrópicas, denotam a necessidade urgente de criação de uma unidade de conservação na área.

### *Objetivos*

Apresentar a diversidade da fauna troglóbia do lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN, bem como testar, utilizando análises filogeográficas com base na distribuição das populações de *K. troglobia*, a hipótese de que o lajedo do Rosário é funcionalmente um habitat subterrâneo contínuo e deve ser considerado um hotspot de biodiversidade subterrânea. Espera-se que o lajedo do Rosário consista em um agrupamento de cavernas conectadas por pequenas cavidades e fissuras não acessíveis ao ser humano, permitindo o fluxo gênico local entre diferentes cavernas do afloramento. Nessas condições, indivíduos de *K. troglobia* coletados em diferentes cavernas no lajedo devem pertencer a uma mesma população.

### *Destaques e resultados*

- Culver & Sket (2000) introduziram o conceito de hotspots de biodiversidade subterrânea – cavernas ou sistemas de cavernas com 20 ou mais espécies troglóbias – e identificaram 20 localidades que atenderam ao critério. Posteriormente, Culver & Pipan (2009) identificaram outros 16 hotspots, no entanto nenhum havia sido identificado na região Neotropical até Souza-Silva & Ferreira (2016) inserirem dois hotspots brasileiros, a Toca do Gonçalo (Bahia) e o Sistema Areias (São Paulo), na seleta lista. Dos 38 hotspots identificados à época, apenas cinco estavam na região tropical (Pipan et al. 2020), mas recentemente outros dois hotspots foram identificados no Brasil: o Sistema Águas Claras, na região da Serra do Ramalho (Ferreira et al. 2023), e o Sistema Iगतu, na região da Chapada Diamantina (Gallão et al. 2023), ambos no estado da Bahia. Diversos outros podem existir no Brasil, tendo em vista que os habitats subterrâneos tropicais são relativamente pouco estudados em relação aos temperados, e os esforços de amostragem são concentrados em poucas regiões do país (Trajano &

Bichuette 2010, Souza-Silva et al. 2015, Souza-Silva & Ferreira, 2016, Souza et al. 2017).

- O Oeste Potiguar se destaca pela riqueza de espécies troglóbias, incluindo os únicos relictos oceânicos no país. Isso é o resultado de uma combinação única no Brasil com a presença de um aquífero cárstico em uma região atualmente semiárida marcada por mudanças paleoclimáticas, incluindo transgressões e regressões oceânicas (Wang et al. 2004, Fisër et al. 2013, Rosseti et al. 2013, Costa et al. 2018, Souza et al. 2018, Bento et al. 2021).

- Parte considerável dessa riqueza encontra-se em um único afloramento calcário, o lajedo do Rosário, no município de Felipe Guerra. Esse afloramento possui a maior concentração de cavernas da região (73) (CANIE/CECAV 2020), e pelo menos cinco espécies troglóbias ocorrem em duas ou mais cavernas em áreas distintas no afloramento (Bento et al. 2021). Esse compartilhamento de espécies sugere a existência de conectividade subterrânea, fato que possibilitaria considerar o lajedo do Rosário como um sistema de cavernas, um habitat subterrâneo contínuo.

- Dentre as espécies troglóbias do lajedo do Rosário está a cigarrinha *Kinnapotiguara troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 (Hemiptera: Fulgoromorpha: Kinnaridae), com ocorrência registrada até o momento em cinco cavernas distribuídas por toda a extensão do afloramento (Ferreira et al. 2010, Hoch & Ferreira 2013, Bento et al. 2021). O gênero *Kinnapotiguara* ocorre em outras 14 cavernas nos municípios vizinhos de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado (GDS Rosado), em uma área de aproximadamente 50 km<sup>2</sup>. Tal distribuição poderia ser explicada pela possível existência de conectividade entre as cavernas da região, que seria mantida por um sistema de mesocavernas, permitindo a dispersão subterrânea e mantendo o fluxo gênico entre as populações, como observado para algumas espécies troglóbias em diferentes regiões do mundo (Juberthie et al. 1980, Juberthie 2000, Hoch & Ferreira 2013).

- Além das cavernas para as quais já havia registros de *Kinnapotiguara*, foram realizadas coletas em outras cavernas com habitats adequados em toda a área de ocorrência do táxon. As análises filogenéticas e filogeográficas foram

baseadas em sequências parciais do gene *cox1* de 659 pb de 126 indivíduos de *Kinnapotiguara troglobia* coletados em 19 cavernas (Figura 11).

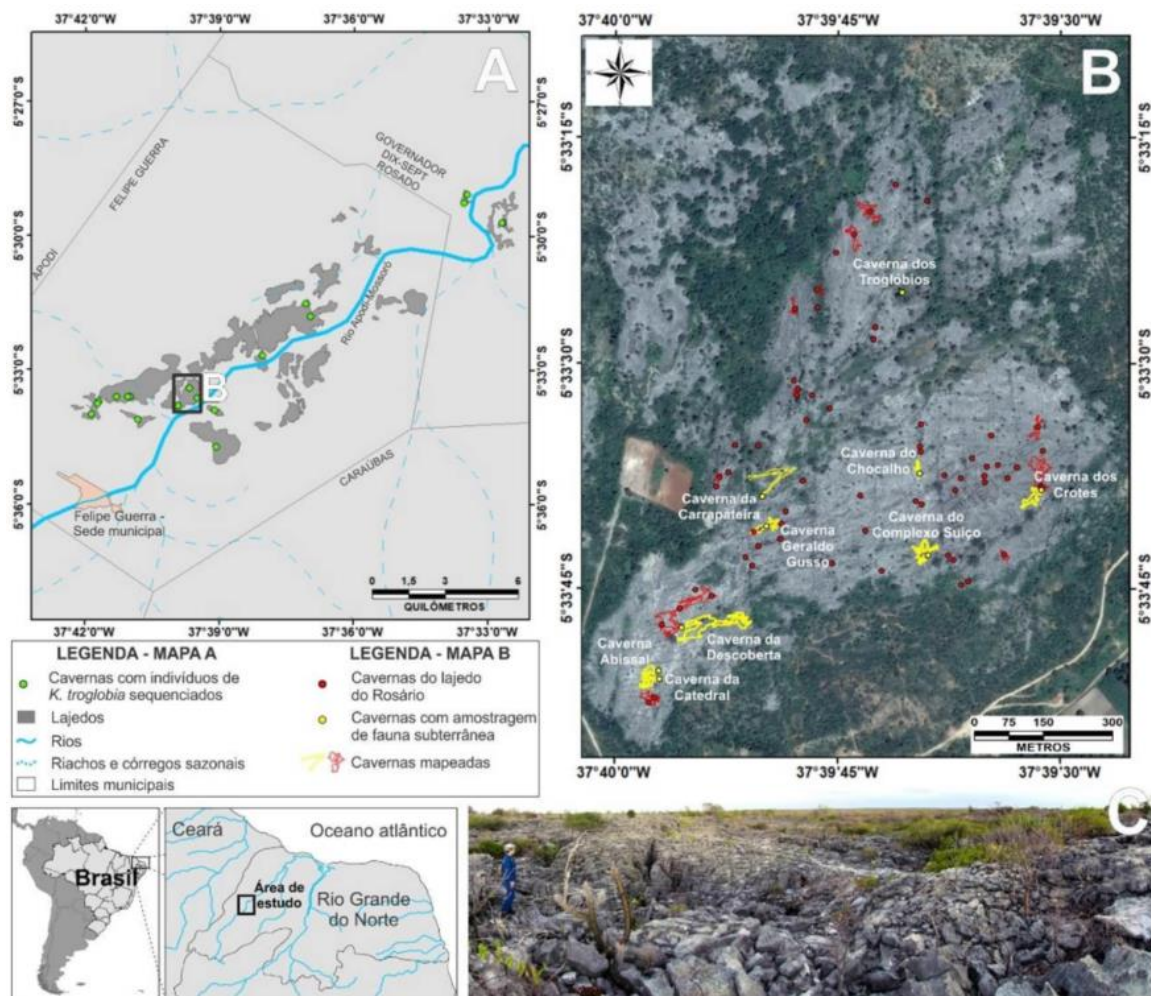


Figura 11. Localização das cavernas com ocorrência de *Kinnapotiguara* e coleta de indivíduos para sequenciamento (A), além da distribuição das cavernas conhecidas, atualmente mapeadas e com inventários bioespeleológicos na área do lajedo do Rosário (B). Imagem panorâmica do lajedo do Rosário (C).

- O levantamento de dados referentes à fauna troglóbia do lajedo do Rosário foi realizado a partir da literatura publicada (Ferreira et al. 2010, Hoch & Ferreira 2013, Ázara & Ferreira 2014, Leal-Zanchet et al. 2014, Bento et al. 2016, Bento et al. 2021). Um total de 24 espécies troglóbias encontra-se registrado na literatura para nove cavernas amostradas no Lajeado do Rosário (Tabela 2), pertencentes aos seguintes táxons: Araneae (3), Opiliones (1), Pseudoscorpiones (1), Diplopoda (1), Chilopoda (3), Isopoda (4), Amphipoda (2), Copepoda (1), Ostracoda (1), Collembola (2), Diplura (1), Coleoptera (1), Hemiptera (1), Oligochaeta (1) e Tricladida (1) (Tabela 2 e Figura 12).

Tabela 2. Distribuição da fauna troglóbia do lajedo do Rosário nas diferentes cavernas e habitats amostrados. T: Terrestre; A: Aquático; E: Epicarste. CRO – Caverna dos Crotes; ABI – Caverna Abissal; CAR – Caverna da Carrapateira; CAT – Caverna da Catedral; CCS – Caverna do Complexo Suiço; CHO – Caverna do Chocalho; DBT – Caverna da Descoberta; TRO – Caverna dos Troglóbios; GEG – Caverna do Geraldo Gusso.

TAXA	ESPÉCIE/ MORFOESPÉCIE	HABITAT	CAVERNAS								
			CRO	ABI	CAR	CAT	CCS	CHO	DBT	TRO	GEG
Araneae	Araneae sp.	T	X					X	X		
	Prodidomidae sp.	T									X
	Ocheroцерatidae sp.	T									X
Opiliones	Gonyleptidae sp.	T		X							
Pseudoscorpiones	Chthoniidae sp.	T									X
Diplopoda	Polydesmida sp.	T		X							
Chilopoda	Geophilomorpha sp.	T									X
	Lithobiomorpha sp.	T									X
	<i>Newportia potiguar</i>	T				X					X
Isopoda	Cirolanidae sp1.n	A									X
	Cirolanidae sp2.n.	A/E	X								
	Styloniscidae sp.	T									X
	Calabozoidea sp.	A/E	X								
Amphipoda	<i>Potiberaba porakuara</i>	A									X
	<i>Potiberaba</i> sp.n.	A/E	X								
Copepoda	Copepoda sp.	A									X
Ostracoda	Ostracoda sp.	A/E		X							
Collembola	<i>Arrhopalites</i> sp.n.	T	X	X							
	<i>Cyphoderus</i> sp.n.	T			X			X			
Diplura	Japygidae sp.	T								X	
Coleoptera	Carabidae sp.	T									X
Hemiptera	<i>K. troglobia</i>	T	X					X		X	X
Oligochaeta	Oligochaeta sp.	A/E	X								
Tricladida	<i>Hausera hauseri</i>	A/E	X								

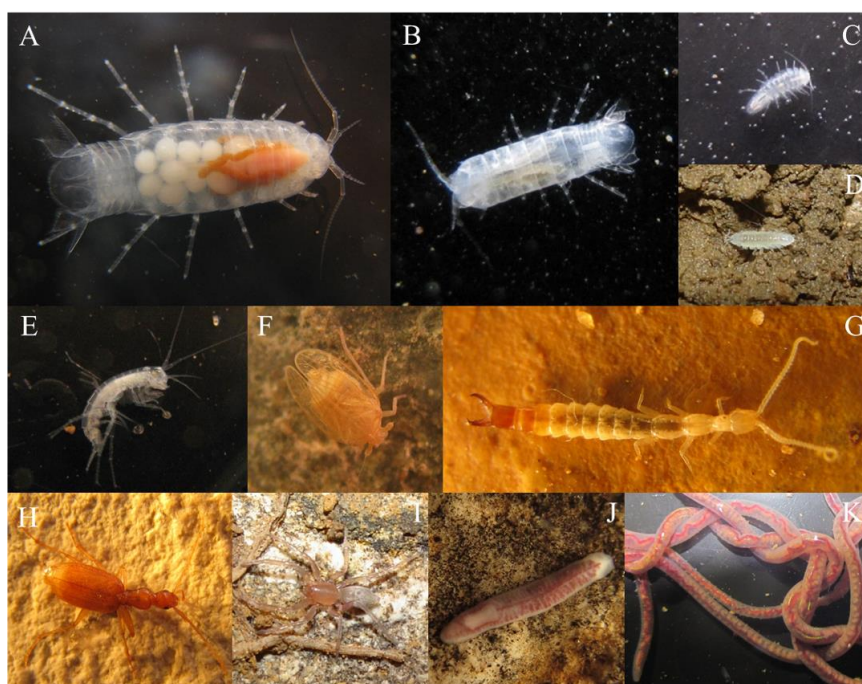


Figura 12: Algumas espécies troglóbicas que ocorrem no lajedo do Rosário: Cirolanidae sp. n1. (A), Cirolanidae sp. n2. (B), Calabozoidea (C), Styloniscidae sp. n. (D), Potiberaba Porakuara (E), Kinnapotiguara troglobia (F), Japygidae sp. n (G), Carabidae sp. n. (H), Prodidomidae sp. n (I), Hausera hauseri (J) e Oligochaeta sp. n (K).

- Foram identificados 19 haplótipos entre os indivíduos sequenciados de *Kinnapotiguara*, geralmente separados por vários passos mutacionais e únicos de cada caverna, com exceção do Hap\_1 (compartilhado entre três cavernas no lajedo do Rosário), Hap\_10, Hap\_14 e Hap\_15 (entre cavernas do lajedo da Lapa) e Hap\_19 (entre cavernas do lajedo dos Angicos) (Figura 13).

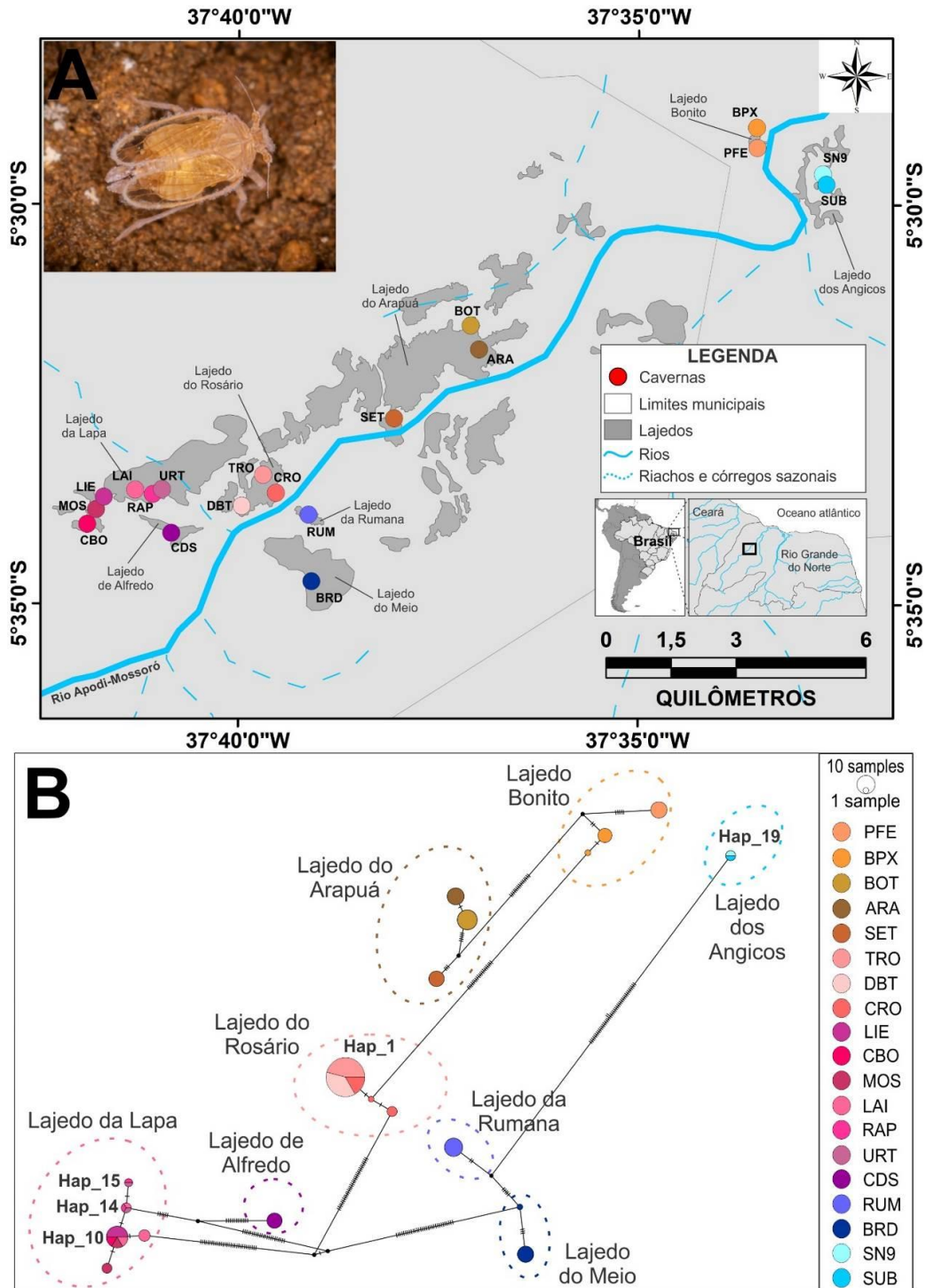


Figura 13: Localização das cavernas com ocorrência de *Kinnapotiguara* e indivíduos com Cox1 sequenciado (A), além de rede de haplótipos com os passos mutacionais inferidos (B). Siglas das cavernas em A de acordo com a Tabela 1.

- Os haplótipos compartilhados são indicativos da existência de fluxo gênico entre cavernas. Isso foi corroborado pelas comparações par-a-par do índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ), em sua maioria iguais a 1.00 ou muito próximos, e significativos, apontando intensa estruturação populacional e fluxo gênico restrito ou inexistente entre linhagens na maioria das cavernas. No entanto, há valores baixos e não significativos de  $\Phi_{ST}$  entre as sequências do *cox1* de indivíduos coletados nas diferentes cavernas do Lajedo do Rosário.

- A Análise de Variância Molecular (AMOVA) apontou que o agrupamento das cavernas nos diferentes afloramentos calcários (lajedos) explica 94,94% da variação genética observada ( $\Phi_{CT} = 0.949$ ,  $p < 0.001$ ). A Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) aponta que o particionamento em 12 populações explica 99,09% da variação genética observada em *Kinnapotiguara* ( $\Phi_{CT} = 0.991$ ,  $p < 0.0001$ , Tabela 6), indicando que agrupamento das cavernas no Lajedo do Rosário constitui uma mesma população. Esses resultados foram corroborados ainda pela análise de inferência bayesiana da estrutura genética de populações, que indicou três agrupamento para *K. troglobia* no Lajedo do Rosário (probabilidade = 1,  $\log (ml) = -7.68$ ), sendo um deles formado por indivíduos de todas as três cavernas.

- Todas essas análises apontaram para uma estruturação populacional extrema em *Kinnapotiguara*, cuja regra é o isolamento de populações em apenas uma caverna. A principal exceção é o Lajedo do Rosário, que possui uma única população que inclui indivíduos de todas as cavernas amostradas. Tendo em vista esse padrão filogeográfico contrastante, é razoável supor que a conectividade biológica subterrânea existente também ocorra para as outras espécies troglóbias no Lajedo do Rosário. Isso corrobora a hipótese de que o Lajedo é um modelo análogo a um agrupamento de cavernas interconectadas por juntas e fraturas e constitui um habitat subterrâneo contínuo, cuja conectividade pôde ser atestada com o uso de *K. troglobia* como um “traçador biológico”. O raciocínio é análogo ao uso amplamente aceito de traçadores químicos para confirmar a conectividade hidrológica em sistemas de cavernas, inclusive usado

no Sistema Areias – um dos hotspots de biodiversidade subterrânea Neotropical (Sanchez 1992, Ferrari & Karmann 2008, Trajano 2007, Souza-Silva & Ferreira 2016).

- Com as 24 espécies troglóbias identificadas, o lajedo do Rosário concentra mais da metade da riqueza de espécies troglóbias (57) registradas até o momento para todo o oeste da formação Jandaíra (Bento et al. 2021), apesar de ocupar uma área de apenas 0,7 km<sup>2</sup> (Carneiro et al. 2015). Além disso, abriga as duas cavernas com a maior riqueza de troglóbios – a caverna dos Troglóbios (11 espécies) e a caverna dos Crotos (8) (Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2021).

### *Conclusões*

- Por todos os motivos expostos, o Lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN, deve ser considerado um hotspot de biodiversidade subterrânea de acordo com a definição de Culver & Sket (2000), já que abriga 24 espécies troglóbias.

- A área do lajedo do Rosário foi considerada como a mais prioritária para a conservação da diversidade genética de espécies troglóbias no oeste da Formação Jandaíra (Bento et al. 2024), como mencionado no item anterior. Está inserido ainda nas Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Repartição de Benefícios da Biodiversidade Prioritárias para a Biodiversidade da Caatinga (MMA 2018), bem como nas Áreas prioritárias para conservação do patrimônio espeleológico Brasileiro (ICMBio/CECAV 2018).

- Além disso, o elevado nível de endemismo da maioria dos troglóbios encontrados, além das várias espécies de relictos, oceânicos e filogenéticos como os Calabozoidea (Isopoda), tem um desdobramento importante em relação à aplicação da atual legislação que trata do patrimônio espeleológico, que prevê que cavernas com ocorrência de troglóbios raros, endêmicos ou relictos devem ser consideradas de máxima relevância, o que impossibilita impactos negativos irreversíveis e a operação de diversos tipos de empreendimentos e atividades incompatíveis. Tais restrições podem ser uma oportunidade para incentivar o uso sustentável, gestão participativa e educação ambiental como instrumentos para a conservação do patrimônio espeleológico na região.

- O lajedo do Rosário seria apenas o quinto hotspot de biodiversidade subterrânea identificado no Brasil. Apesar dessa singularidade, não há na legislação ambiental brasileira qualquer garantia expressa de proteção específica para tais cavernas ou sistemas de cavernas únicos. Essa importante área encontra-se em região com crescente pressão sobre as áreas de ocorrência de cavernas em função de atividades como mineração, visitação desordenada e agricultura irrigada (inclusive com utilização de água do aquífero Jandaíra) (Cruz et al. 2010, Ferreira et al. 2010, Bento et al. 2024). Isso denota a necessidade urgente de ações voltadas à criação de uma Unidade de Conservação na área.

### 3.1.7. Vida nas CaveRNas: proposta de cartilha como ferramenta de educação ambiental e material didático no ensino de Ciências

Trata-se do quarto capítulo da Tese, que foi apresentado como resumo expandido no 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia (Figura 14), em 2022, e resultou na publicação, em versões impressa e digital, da cartilha “Vida nas Cavernas” (Figura 14), também em 2022. Os originais podem ser acessados em [https://www.cavernas.org.br/wp-content/uploads/2021/02/36cbe\\_200-230.pdf](https://www.cavernas.org.br/wp-content/uploads/2021/02/36cbe_200-230.pdf) (resumo expandido), [https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/publicacoes/vida\\_nas\\_cavernas.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/publicacoes/vida_nas_cavernas.pdf) (cartilha) e <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/44928> (Tese), e constam também nos anexos a este relatório.

O trabalho também foi premiado como melhor resumo expandido e melhor apresentação de pôster durante o 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia (Figura 15).

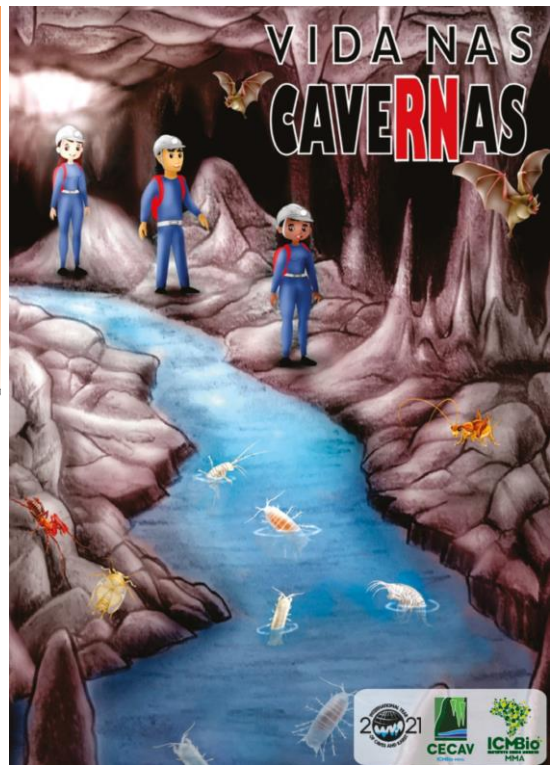
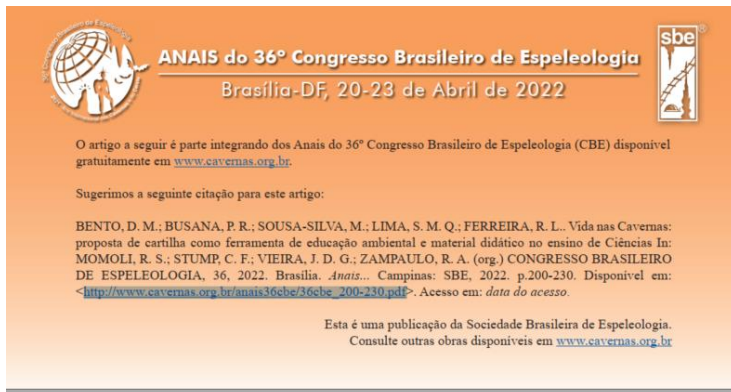


Figura 14. Resumo expandido apresentado no 36º Congresso Nacional de Espeleologia, em 2022, e publicado nos anais do evento (esquerda), e capa da cartilha “Vida nas CaveRNas” (direita).

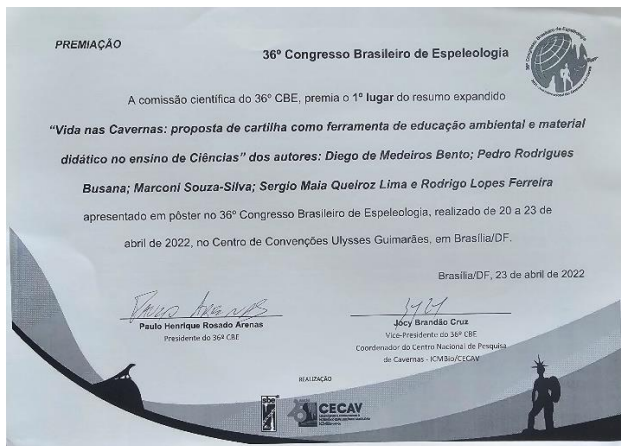


Figura 15. Certificados de premiação de melhor resumo expandido (esquerda) e melhor apresentação de pôster (direita) durante o 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia.

A seguir, apresentamos o resumo e os principais destaques do trabalho.

## *Resumo*

Devido a suas fragilidades intrínsecas, as cavernas e sua biodiversidade associada estão diferencialmente expostas a impactos decorrentes de atividades antrópicas. Embora a educação ambiental tenha importância fundamental na formação de cidadãos conscientes, ações focadas nas comunidades no entorno de cavernas ainda são relativamente incomuns. Nesse contexto, a biologia subterrânea pode auxiliar a educação ambiental na divulgação e valorização de um dos habitats menos conhecidos, que são as cavernas. Apresentamos a cartilha educativa “Vida nas caveRNas”, com foco na fauna cavernícola do oeste do estado do Rio Grande do Norte (RN), particularmente espécies troglóbias endêmicas e sua história evolutiva. O material aborda também características gerais da Caatinga e outras espécies frequentemente encontradas nas cavernas, suas relações ecológicas e os impactos observados na região. Os impactos são abordados não só em relação a seus efeitos sobre o ambiente subterrâneo, mas também aos ambientes superficiais e que podem até mesmo afetar atividades humanas. Também são apresentadas soluções para esses impactos, destacando que é possível a conciliação entre atividades humanas e a conservação do patrimônio espeleológico. Além da história em quadrinhos, há informações sobre as espécies que inspiraram os personagens e algumas atividades lúdicas, com o objetivo de fixar o conhecimento apresentado. A cartilha foi elaborada como uma estratégia educacional auxiliar no processo de ensino-aprendizagem da disciplina de Ciências dos anos finais do ensino fundamental, bem como em outras ações de educação ambiental, de forma a despertar o interesse sobre as cavernas, seus habitantes e sua conservação. A sua adoção, principalmente em uma estratégia continuada de educação ambiental, certamente auxiliará na conservação do patrimônio espeleológico excepcional existente no oeste do RN. Por fim, recomendamos a elaboração de materiais didáticos baseados em contextos regional e até mesmo local, e o modelo aqui apresentado pode ser seguido para a elaboração de cartilhas destinadas a outras regiões específicas do Brasil. No entanto, tais materiais devem ser elaborados de forma responsável e cautelosa, além de baseados em amplo conhecimento científico.

### *Objetivos*

Apresentar uma cartilha educativa com foco na fauna de invertebrados encontrados em cavernas no oeste do estado do Rio Grande do Norte, particularmente espécies troglóbias endêmicas e sua história evolutiva. O material foi elaborado como uma estratégia educacional auxiliar no processo de ensino-aprendizagem da disciplina de Ciências dos anos finais do ensino fundamental, de forma a despertar nos alunos o interesse sobre as cavernas, seus habitantes e sua conservação.

### *Destaques e resultados*

- O material foi formulado visando sua utilização principalmente nas escolas de ensino fundamental nos municípios com ocorrência de cavernas na região oeste do RN (principalmente Felipe Guerra, Governador Dix-Sept Rosado, Mossoró e Baraúna). No entanto, sua utilização é possível também em outros níveis de ensino (como em disciplinas de Biologia e Geografia, no Ensino Médio, por exemplo) e em outras ações de educação ambiental.

- Como mencionado anteriormente, a cartilha digital pode ser baixada diretamente no site do Cecav ( [https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/publicacoes/vida\\_nas\\_cavernas.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/publicacoes/vida_nas_cavernas.pdf)). Foram impressas inicialmente 3.000 cópias, sendo destinadas a ações de educação ambiental com diversos parceiros.

- Na principal delas, foi realizada uma articulação junto às secretarias municipais de educação dos municípios potiguares de Felipe Guerra e Baraúna (os dois municípios com mais cavernas no RN) para utilização das cartilhas nas escolas municipais. Em março de 2022, das 3.000 cartilhas impressas, 1.700 foram entregues à prefeitura de Baraúna e 800 à prefeitura de Felipe Guerra (Figura 16). Essas cartilhas foram entregues aos professores e alunos.

- Posteriormente, em março de 2023, foi realizada uma capacitação com os professores de ambos os municípios. A capacitação envolveu uma introdução à espeleologia e biologia subterrânea, leitura comentada da cartilha e visita a cavernas da região. Foram capacitados cerca de 12 professores de Felipe Guerra e cerca de 40 professores de Baraúna (Figura 16).

- Esse processo de utilização da cartilha e capacitação dos professores foi avaliado por meio da aplicação de questionários, tanto aos professores quanto aos alunos, antes e após as capacitações e o ano letivo. Essa avaliação ainda está em andamento e faz parte do doutorado da pesquisadora Valéria Vale, aluna do Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da UFRN.



Figura 16. Entrega das cartilhas às equipes das secretarias municipais de educação de Baraúna (acima à esquerda) e Felipe Guerra (acima à direita). Capacitação teórica e visita às cavernas com os professores de Baraúna, na Furna Feia (fotos no centro), e de Felipe Guerra, na caverna dos Crotes (fotos abaixo).

- As cartilhas também foram utilizadas em ações de educação ambiental e atividades didáticas do espaço Casa de Leitura do projeto UFERSA Ambiental ( <https://ambiental.ufersa.edu.br/> ), da Universidade Federal Rural do Semiárido. O projeto, coordenado pela Profa. Dra. Diana Lunardi, recebe crianças da rede pública e público em geral, e também realiza atividades em comunidades carentes (como quilombolas, por exemplo) (Figura 17).



Figura 17. A cartilha “Vida nas caveRNas” sendo utilizada em atividades do projeto UFERSA Ambiental.

## *Conclusões*

- Com a elaboração da cartilha “Vida nas CaveRNas”, foi possível resumir os principais resultados da Tese, de maneira ricamente ilustrada e em linguagem didática e acessível.

- A articulação junto às secretarias municipais de educação de Baraúna e Felipe Guerra proporcionou à distribuição do material para professores e alunos, a capacitação dos professores para o uso da cartilha e sua utilização em sala de aula no ensino formal. A efetividade da estratégia está sendo avaliada e resultará em um dos capítulos da Tese de Doutorado da pesquisadora Valéria Vale, e será disponibilizada assim que concluída.

- A utilização da cartilha em atividades do projeto UFERSA Ambiental ampliou seu alcance para muito além do esperado inicialmente, atingindo crianças e adolescentes de comunidades carentes e quilombolas. Entendemos, assim, que o objetivo de despertar nos alunos o interesse sobre as cavernas, seus habitantes e sua conservação foi plenamente alcançado.

### **3.2. Taxonomia de tricládidos aquáticos (Platyhelminthes) em ambientes espeleológicos da região Neotropical.**

Este subprojeto resultou na Tese de Doutorado da pesquisadora Lindsey Hellmann. Ela foi defendida e aprovada em março de 2021, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, área de concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS. A tese está disponível nos anexos a este relatório.

Houve uma série de problemas quando se tentou extrair DNA das planárias de cavernas da área do projeto, apesar de diversas tentativas com protocolos diferentes. Na maior parte das vezes, não foi obtido DNA em quantidade e qualidade suficientes para a obtenção de bom sequenciamento de marcadores genéticos e não foi possível sequenciar indivíduos de todas as localidades e em quantidade suficiente para as análises filogenéticas e filogeográficas. Assim, a

tese trouxe a identificação tradicional de três novas espécies de planárias troglóbias do estado do Rio Grande do Norte, baseada em análises morfológicas.

Isso, no entanto, não impediu a publicação de artigos em revistas de alto impacto abordando análises filogenéticas com espécies de planárias da área do projeto. Em 2020, foi publicado o artigo “Phylogeny and biogeography of the Cavernicola (Platyhelminthes: Tricladida): Relicts of an epigeal group sheltering in caves?” na prestigiada revista “Molecular Phylogenetics and Evolution” (Figura 18). O artigo pode ser consultado na íntegra no endereço <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106709>, e também está nos anexos a este relatório.

Molecular Phylogenetics and Evolution 145 (2020) 106709



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ympev](http://www.elsevier.com/locate/ympev)



### Phylogeny and biogeography of the Cavernicola (Platyhelminthes: Tricladida): Relicts of an epigeal group sheltering in caves?



Lisandra Benítez-Álvarez<sup>a</sup>, Ana Maria Leal-Zanchet<sup>b</sup>, Alejandro Ocegüera-Figueroa<sup>c</sup>, Rodrigo Lopes Ferreira<sup>d</sup>, Diego de Medeiros Bento<sup>e</sup>, João Braccini<sup>b</sup>, Ronald Sluys<sup>f</sup>, Marta Riutort<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística and Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Pesquisas de Planárias and Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), 93022-750 São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán, C.P. 04510, A.P. 70-153, Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Centro de Estudos em Biologia Subterrânea, Setor de Biodiversidade Subterrânea, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> ICMBio/CECAV-RN – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas, 59015-350 Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

<sup>f</sup> Naturalis Biodiversity Center, P.O. Box 9517, 2300 RA Leiden, The Netherlands

Figura 18. Artigo abordando análises filogenéticas com espécies de planárias da área do projeto, publicado no periódico internacional “Molecular Phylogenetics and Evolution”.

Parte dos resultados da tese também foi publicada como resumo nos anais do II Simpósio Brasileiro de Biologia Subterrânea (SBBS), realizado de 02 a 06 de outubro de 2017 na Universidade Federal de Lavras, em Lavras/MG (Figura 19).

16:00 – PÔSTER 20

**PLANÁRIAS AQUÁTICAS (PLATYHELMINTHES: TRICLADIDA) EM AMBIENTES ESPELEOLÓGICOS DO BRASIL**

Lindsey Hellmann\*, Silvana Vargas do Amaral, Rafaela Canello, Ana Laura Morais, Ana Maria Leal-Zanchet  
Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo, Rio Grande do Sul. E-mail: [lindyhellmann@hotmail.com](mailto:lindyhellmann@hotmail.com).

Planárias aquáticas podem ser encontradas em ambientes epígeos (rios, lagos, córregos) e hipógeos. Na região Neotropical, a diversidade taxonômica de planárias aquáticas, especialmente em ambientes hipógeos, é limitada a poucos registros nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil. No presente estudo, apresentamos um levantamento da diversidade taxonômica de planárias aquáticas coletadas em diferentes ambientes espeleológicos do Brasil. Os indivíduos foram coletados de forma direta em cavernas do Pará, Rio Grande do Norte, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Posteriormente, foram fixados em formalina ou álcool 70%. Para identificação dos organismos, foi analisada inicialmente a morfologia externa, levando em consideração a coloração corporal, presença de aurículas e ocelos, medidas corporais e observação de eventuais características troglomórficas. Em seguida, os espécimes foram submetidos a processamento histológico para análise da morfologia interna em microscópio óptico. A partir das análises morfológicas, os espécimes foram identificados até o menor nível taxonômico possível. Foram coletados 151 indivíduos, pertencentes a três famílias: Dimarcusidae, Uteriporidae e Dugesiidae, distribuídos em cinco gêneros e 29 espécies. A família Uteriporidae está representada por uma espécie. As demais espécies pertencem aos gêneros *Girardia*, *Hausera* e a dois potenciais novos gêneros das famílias Dimarcusidae e Dugesiidae, respectivamente. Dentre as 29 espécies, três estão em processo de descrição e somente cinco espécies são conhecidas: *Girardia paramensis*, *G. desideriensis*, *G. pierremartini*, *G. multidiverticulata* e *Hausera hauseri*. As espécies restantes são possivelmente novas para a ciência. O gênero *Girardia* é o mais representativo, com 23 espécies, seguido pelo gênero *Hausera* com duas espécies. Vinte espécies são consideradas troglóbias por apresentarem características troglomórficas típicas, como ausência de pigmentação corporal e ocelos. Vinte espécies foram encontradas somente numa única localidade. Diante do cenário de escasso conhecimento sobre os tricládidos aquáticos de cavernas brasileiras, os resultados indicam a necessidade de ampliação de estudos taxonômicos e da distribuição de planárias cavernícolas, visando à conservação dos ambientes espeleológicos, visto que são provavelmente espécies com distribuição restrita e muitas delas são organismos troglóbios.

Palavras-chave: Turbelários; Taxonomia; Organismos troglóbios.

Apoio Financeiro: CAPES

Figura 19. Resumo publicado nos anais do II Simpósio Brasileiro de Biologia Subterrânea (SBBS).

- Retornando à Tese propriamente dita, ela foi dividida em três capítulos. O primeiro capítulo descreve três novas espécies troglóbias do gênero *Hausera* (Tricladida: Cavernicola), de três cavernas da Formação Jandaíra, no estado do Rio Grande do Norte. No segundo capítulo realiza-se a descrição de um novo gênero e nova espécie troglóbia da família Dugesiidae (Contineticola) de uma caverna do bioma Caatinga. No terceiro capítulo, descreve-se três novas espécies do gênero *Girardia* (Tricladida Dugesiidade) com base em espécimes coletados em três cavernas dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. Como apenas o primeiro capítulo envolve espécies troglóbias das áreas alvo do projeto, trataremos de maneira mais detalhada apenas dele neste relatório.

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados da Tese.

### 3.2.1. Resumo geral

A conservação dos ecossistemas cavernícolas é importante para a manutenção das relações ecológicas do ambiente e de seu entorno, exigindo propostas concretas vindas de políticas públicas integradas e que considerem efetivamente suas características ambientais como clima, luminosidade e biota, a fim de garantir o estado de conservação desses ecossistemas únicos. A legislação brasileira regulamenta diretrizes para a gestão e conservação de ecossistemas subterrâneos. Portanto, estudos de determinação taxonômica dos organismos cavernícolas, entre eles planárias, e de detecção de espécies troglóbias, de distribuição restrita ou endêmicas são primordiais para a atualização dessa legislação. A forma de utilização dos recursos alimentares e outros aspectos da relação dos organismos com o ambiente cavernícola podem ser utilizados para classificar a fauna em três categorias: troglóbios, trogló Xenos e troglófilos. Os troglóbios possuem ciclo de vida restrito ao ambiente cavernícola e são normalmente os mais especializados em resposta às pressões seletivas do ambiente. O objetivo do presente trabalho é contribuir para o conhecimento da distribuição e diversidade taxonômica de tricládidos em ambientes espeleológicos da Região Neotropical, bem como para a conservação desses ambientes, verificando a ocorrência e distribuição de tricládidos troglóbios e/ou de distribuição restrita. Além disso, propor novos caracteres, com base em análises morfológicas, para diagnose das espécies para o gênero monotípico *Hausera* (Cavernicola). Durante o trabalho de campo, os espécimes foram coletados de forma direta, com auxílio de pincel e pipeta de Pasteur. Os espécimes foram fixados diretamente em etanol absoluto ou etanol 70%. Os indivíduos foram desidratados e embebidos em paraplasto, após este material foi cortado a 6µm e os corte foram corados com hematoxilina/eosina e tricrômico de Masson/Goldner. No momento das coletas as planárias foram fotografadas vivas e também após a fixação. A morfologia externa foi analisada em estereomicroscópio e a morfologia interna, a partir de cortes sagitais, transversais e horizontais, foi analisada em microscópio óptico, sendo feita reconstrução do

aparelho reprodutor com auxílio de câmara clara. No Capítulo I descrevem-se três novas espécies de *Hausera* procedentes de duas cavernas do bioma Caatinga. Representantes das três espécies não apresentam ocelos, aurículas e pigmentação corporal, sendo considerados troglóbios. As três espécies se caracterizam por uma combinação única de caracteres da morfologia externa e do sistema reprodutor. No Capítulo II, descreve-se um novo gênero e espécie da família Dugesiidae procedente do bioma Caatinga. A espécie, troglóbia, sem ocelos e pigmentação corporal, possui cavidade bulbar curta e alongada, presença de canal bursal curto e com porção proximal em fundo cego situado posteriormente ao átrio masculino e ausência de bolsa copulatória típica. No capítulo III descrevem-se três novas espécies de tricládidos da família Dugesiidae (Continenticola), pertencentes ao gênero *Girardia*, coletadas em cavernas dos biomas Cerrado e Mata Atlântica. Uma dessas espécies possui características morfológicas externas tipicamente troglomórficas, tais como ausência de ocelos e pigmentação corporal, sendo considerada troglóbia. As duas espécies de *Girardia* possuem ocelos e certa quantidade de pigmentação corporal, sendo consideradas troglófilas. As amostragens realizadas nas áreas de estudo sugerem que esses são organismos de distribuição restrita. As espécies de *Girardia* descritas neste trabalho não possuem características exclusivas, como ocorre com a maioria das espécies do gênero, mas apresentam um conjunto de características que possibilitam sua diferenciação entre si e dos demais congêneres. Em relação às localidades-tipo dos espécimes estudados, as cavernas dos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica sofrem com ações antrópicas, como turismo e pisoteio ilegal, o que pode resultar na degradação do ambiente. Sendo assim, o conhecimento dos tricládidos descritos neste trabalho é importante para entender a filogenia do gênero *Hausera*, a partir de sua distribuição e morfologia, no bioma Caatinga, além de contribuir para a conservação dos ambientes espeleológicos estudados, visto que são provavelmente espécies com distribuição restrita e a na sua maioria são organismos troglóbios. Portanto, sua ocorrência nas áreas de estudo pode servir para subsidiar programas de gestão e conservação das cavernas e suas áreas de influência conforme a legislação vigente.

### 3.2.2. Introdução geral

O filo Platyhelminthes pode ser subdividido, de acordo com estudos baseados em dados morfológicos e moleculares, em dois grupos: Catenulida e Rhabditophora. Os rhabditóforos incluem vários táxons, entre eles as ordens Polycladida e Tricladida. Os tricládidos dividem-se em três subordens: Continenticola, Cavernicola e Maricola (Sluys et al. 2009, Benitez et al. 2020). Os tricládidos podem ser encontrados em ambientes aquáticos (dulcícola e marinho), sendo que alguns Continenticola ocorrem em ambientes terrestres. Em ambientes dulcícolas são encontrados representantes das subordens Continenticola, Cavernicola e Maricola.

A subordem Continenticola é formada por cinco famílias: Planariidae, Dendrocoelidae, Kenkiidae, Dugesiidae e Geoplanidae sendo a única com representantes terrestres. A diversidade taxonômica de planárias de água doce dessa subordem na região Neotropical é baixa, sendo a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Girardia* Ball, 1974, da família Dugesiidae (Sluys et al. 2005).

Estudos taxonômicos sobre Dugesiidae indicaram a ocorrência de 57 espécies do gênero *Girardia* na Região Neotropical, a maioria coletada na Argentina e Brasil. Para a região Neotropical doze espécies são hipógeas, nove no Brasil e três no México.

A Subordem Cavernicola é formada por uma única família (Dimarcusidae) composta por seis gêneros e sete espécies de distribuição disjunta, incluindo *Hausera hauseri* descrita para um ambiente espeleológico no estado do Rio Grande do Norte (Leal-Zanchet et al. 2014).

Os tricládidos apresentam alta simplicidade morfológica. Essa simplicidade tem, desde o início, dificultado a determinação taxonômica. Para a descrição, inicialmente, é necessário fazer cortes histológicos de indivíduos, que é um processo demorado. Além disso não há chaves taxonômicas para identificar espécies, sendo que a maioria das descrições são muito antigas e com base apenas em caracteres da morfologia externa. Na maioria dos casos, a ausência de

sinapomorfias para a definição de espécies ou grupos taxonômicos torna crucial o uso de dados moleculares para inferir filogenias para a compreensão da origem e evolução de muitas características do grupo, que não poderiam ser entendidas apenas com base de dados morfológicos. No entanto, os marcadores em uso até agora têm demonstrado pouca eficiência na resolução em alguns casos. Novas metodologias são esperadas para ajudar a desenvolver novos marcadores para alcançar uma maior compreensão do grupo, da história evolutiva e ter uma taxonomia mais precisa (Álvarez-Presas et al. 2014).

Sobre a filogenia e distribuição da subordem Cavernicola, estudo realizado por Benitez et al. (2020), com base em análises de dados moleculares, dá suporte à hipótese de que um ancestral de água doce da subordem Cavernicola colonizou habitats epígeos e freáticos continentais e, posteriormente, irradiou para formar um grupo diversificado com ampla distribuição. Nesse cenário, a evolução de Cavernicola constitui um exemplo clássico de diversificação evolutiva, seguido por adaptações independentes para habitats hipógeos, onde cavernas podem ter se tornado um habitat de refúgio para o grupo, por razões ainda não conhecidas. A competição com outras planárias, da subordem Continenticola, ou mudanças no habitat epígeo são duas explicações possíveis - ainda a serem testadas - para a perda da maior parte da diversidade de Cavernicola, que atualmente se reflete em sua distribuição altamente disjunta (Benitez et al. 2020).

Estudos taxonômicos sobre a fauna cavernícola, em especial tricládidos, ainda são limitados. O presente estudo trará informações para ampliar o conhecimento taxonômico e filogenético dos tricládidos aquáticos de ambientes espeleológicos na Região Neotropical.

### 3.2.3. Objetivos

#### *Objetivo geral*

Contribuir para o conhecimento da diversidade taxonômica de tricládidos em ambientes espeleológicos da região Neotropical, bem como para a conservação desses ambientes.

### *Objetivos específicos*

- Verificar a ocorrência de organismos troglóbios e/ou restritos em cavernas da Formação Jandaíra e, também de uma caverna associada a dolomitos do Neoproterozóico no bioma Caatinga. Além de três cavernas dos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, todas cavernas em regiões com litologia calcárea. Dessa forma estabelecer sua distribuição na região Neotropical;

- Registrar a ocorrência e distribuição de tricládidos troglóbios na área de estudo;

- Incluir novos caracteres para o gênero *Hausera*.

3.2.4. Capítulo I - Unexpected diversity of troglobitic *Hausera* (Cavernicola: Dimarcusidae) in limestone caves of a semi-arid Brazilian environment with the description of three new species (Diversidade inesperada de *Hausera* troglóbios (Cavernicola: Dimarcusidae) em cavernas calcárias de um ambiente semiárido brasileiro, com a descrição de três novas espécies)

### *Resumo traduzido*

O gênero *Hausera* Leal-Zanchet & Souza, 2014 é um gênero monotípico proposto para abrigar uma única espécie troglóbia, *H. hauseri* Leal-Zanchet & Souza, 2014, que ocorre em uma caverna calcária da formação Jandaíra situada no bioma Caatinga, que é dominado por um clima semiárido. No presente trabalho, relatamos a ocorrência e descrevemos três novas espécies troglóbias de *Hausera* ocorrendo em duas cavernas diferentes da formação Jandaíra. *Hausera* spp. 1 e 2 ocorrem em simpatria em um local de amostragem. As três espécies apresentam troglomorfismos, como ausência de pigmentação corporal e olhos e são facilmente reconhecidas por uma combinação única de caracteres de sua morfologia externa e aparelho copulador. A análise de outras três espécies do gênero nos permitiu propor uma emenda ao seu diagnóstico.

### *Destaques e resultados*

- As espécies foram coletadas em duas cavernas calcárias localizadas na Formação Jandaíra (Figura 20a), no estado do Rio Grande do Norte, nordeste do

Brasil. *Hausera* spp. 1 e 2 foram coletadas na caverna Furna Feia ( $-05^{\circ} 02' 12,76''$ ;  $-37^{\circ} 33' 36,64''$ ), localizada no Parque Nacional da Furna Feia, no município de Baraúna. *Hausera* sp. 1 foi coletada em cinco locais, enquanto *Hausera* sp. 2 ocorre em um único local (Figura 20b). *Hausera* sp. 3 foi coletada na caverna “Olho D’água do Mamede” ( $-05^{\circ} 24' 37,81''$ ;  $-36^{\circ} 08' 11,28''$ ), localizada no município de Jandaíra.

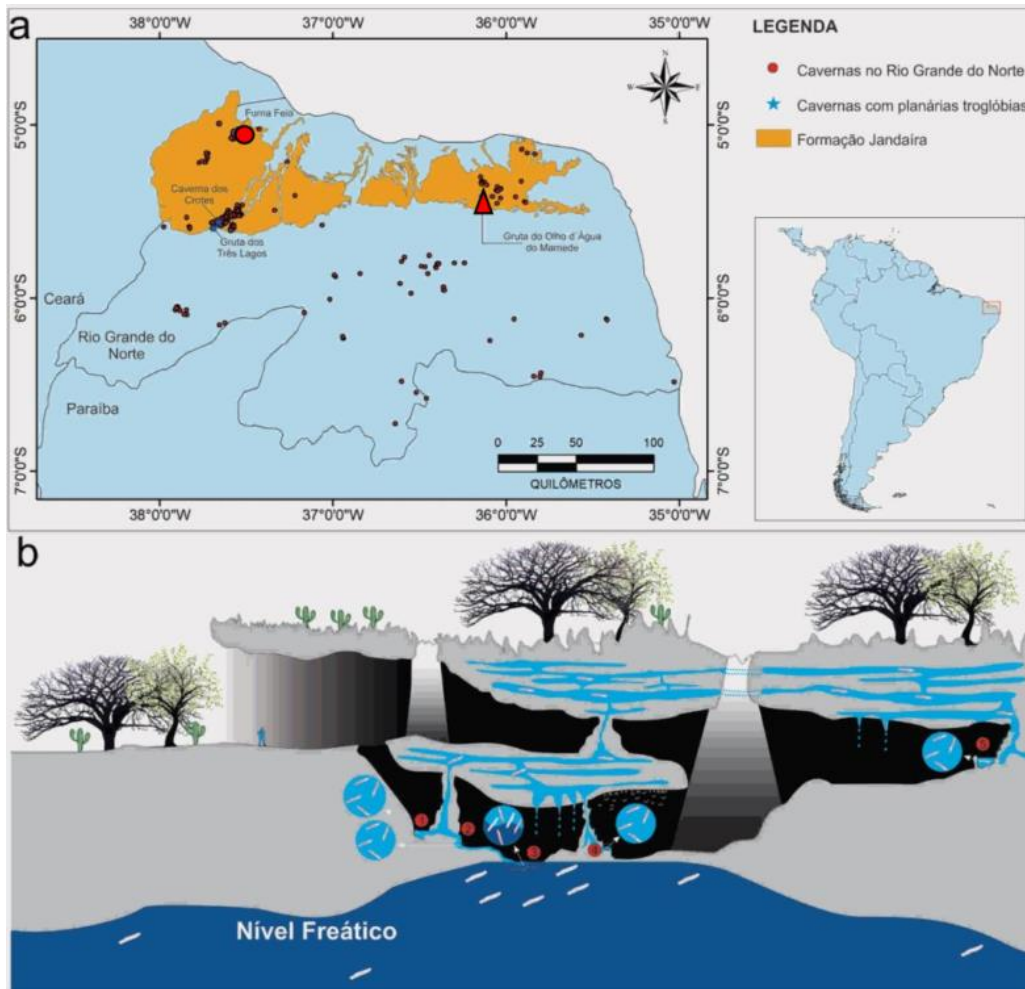


Figura 20. Locais de ocorrência das novas espécies: (a) cavernas Furna Feia e Olho d’Água do Mamede; (b) perfil vertical esquemático representando os locais de amostragem (1-5) na caverna Furna Feia: *Hausera* sp. 1 foi coletada no local 3, e *Hausera* sp. 2 em todos os locais de amostragem.

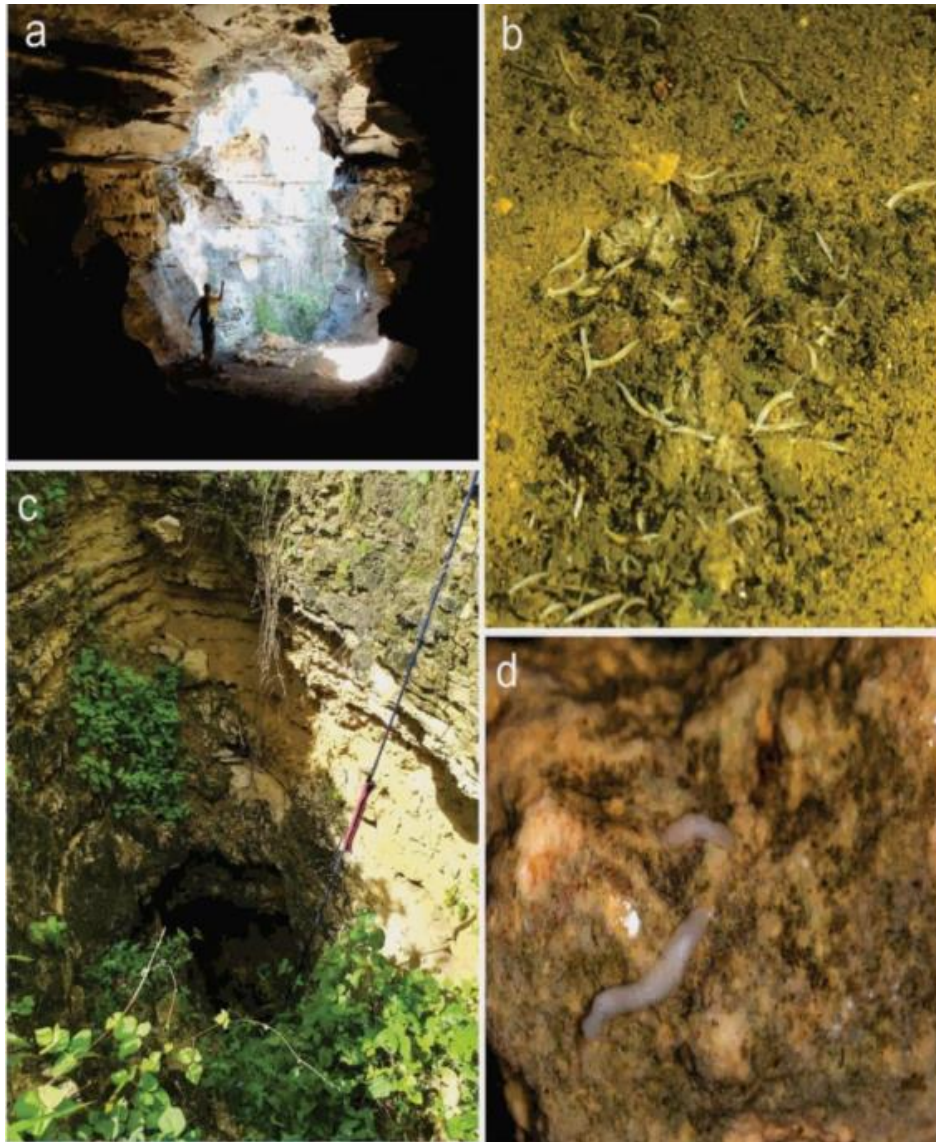


Figura 21. Locais de amostragem: (a) entrada da gruta da Furna Feia; (b) exemplares de *Hausera* spp. 1 e 2 na gruta da Furna Feia no local onde ocorrem em simpatria; (c) entrada da gruta Olho d'Água do Mamede; (d) exemplares de *Hausera* sp. 3 na gruta Olho d'Água do Mamede.

- A nova espécie *Hausera* sp.1 (Figura 22) é encontrada apenas na caverna Furna Feia, em vários locais com acúmulo de água vinda tanto de compartimentos epicársticos (acúmulos de água entre a caverna e a superfície) como em locais onde a caverna intercepta o nível freático (Figura 20b).

- A nova espécie *Hausera* sp.2 (Figura 23) também é encontrada apenas na caverna Furna Feia, mas em apenas em sua porção mais profunda onde o lençol freático é interceptado (Figura 20b).



Figura 22. Fotografias de um espécime preservado (holótipo) da nova espécie *Hausera* sp.1. em vista dorsal (a, acima à esquerda) e ventral (b, abaixo à esquerda). As seis imagens à direita são cortes histológicos sagitais do mesmo indivíduo: (a) faringe, (b-c) região anterior do corpo mostrando testículos (b) e ovário (c), (d-e) aparelho copulador.

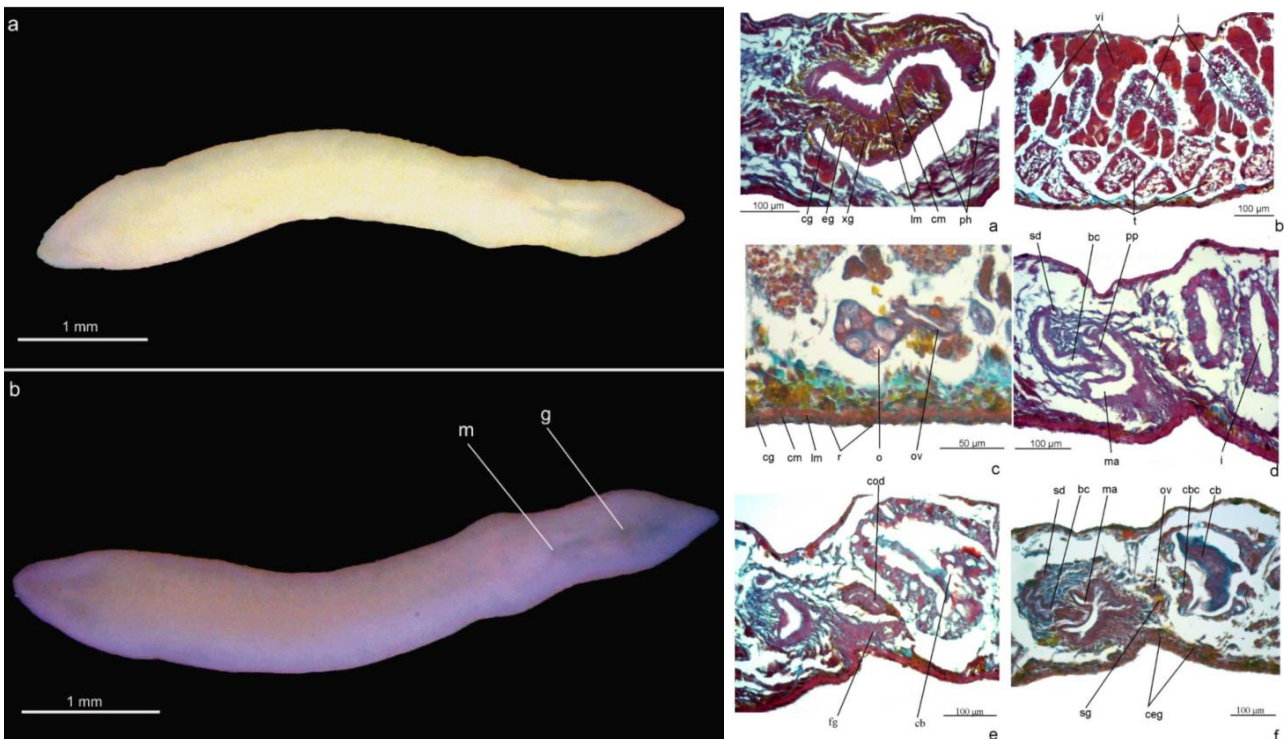


Figura 23. Fotografias de um espécime preservado (holótipo) da nova espécie *Hausera* sp.2. em vista dorsal (a, acima à esquerda) e ventral (b, abaixo à esquerda). As imagens à direita são cortes histológicos sagitais do mesmo indivíduo (a, c e d) e do parátipo (b, f): (a) faringe, (b-c) região anterior do corpo mostrando testículos (b) e ovário (c), (d-e) aparelho copulador.

- A nova espécie *Hausera* sp.3 (Figura 24) é encontrada apenas na caverna Olho d'Água do Mamede, no município de Jandaíra/RN.

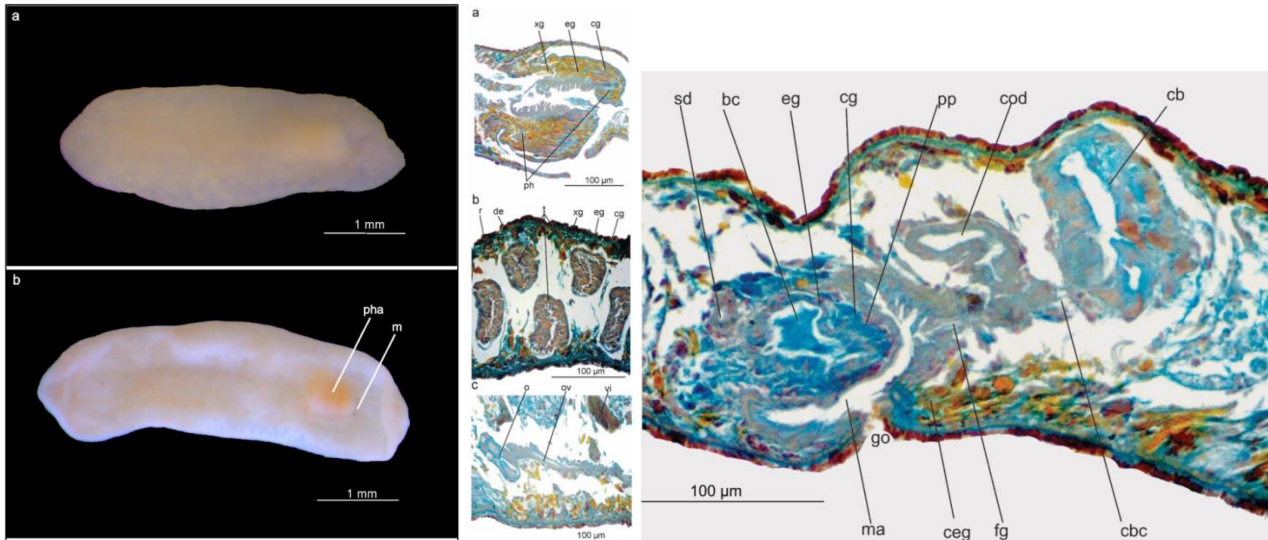


Figura 24. Fotografias de um espécime preservado (holótipo) da nova espécie *Hausera* sp.3. em vista dorsal (a, acima à esquerda) e ventral (b, abaixo à esquerda). As imagens menores no centro são cortes histológicos sagitais do mesmo indivíduo mostrando (a) faringe, testículos (b) e ovário (c). A imagem maior, à direita, mostra o aparelho copulador.

- Em relação às características externas, todas as três novas espécies são representadas por espécimes maduros com dimensões corporais semelhantes, apresentando geralmente comprimento e largura menores do que espécimes maduros de *H. hauseri* (Leal-Zanchet et al. 2014). As novas espécies apresentam algumas diferenças entre si, considerando o formato das pontas anterior e posterior. *Hausera* spp. 1 e 3 apresentam pontas anteriores pontiagudas, enquanto *Hausera* sp. 2 e *H. hauseri* apresentam ponta anterior arredondada (Leal-Zanchet et al., 2014). *Hausera* spp. 1 e 2 apresentam pontas posteriores arredondadas, diferindo de *H. hauseri* e *Hausera* sp. 1, que apresentam pontas posteriores pontiagudas. Similarmente a *H. hauseri*, as novas espécies apresentam troglomorfismos, como corpo esbranquiçado e ausência de olhos (Leal-Zanchet et al. 2014).

- Em todas as espécies de *Hausera*, os testículos estão dispostos próximos às margens do corpo, mas em *Hausera* sp. 1 os testículos estão ausentes atrás da faringe, enquanto se estendem próximos à ponta posterior nas outras duas espécies e em *H. hauseri* (Leal-Zanchet et al. 2014). Em *Hausera* sp. 2 essas gônadas começam ligeiramente anteriores aos ovários e estão dispostas em uma

fileira ventral irregular, diferindo das outras espécies do gênero, que apresentam testículos dispostos em duas fileiras irregulares, aproximando-se da epiderme ventral e dorsal.

- A posição em que os ductos ovovitelinos surgem dos ovários varia entre as três novas espécies e a espécie-tipo do gênero (*H. hauseri*). Nas três novas espécies, os ductos ovovitelinos surgem da extremidade posterior dos ovários, terminalmente em *Hausera* spp. 2 e 3 e lateralmente em *Hausera* sp. 1, contrastando com *H. hauseri*, em que os ductos ovovitelinos surgem das paredes laterais dos ovários (Leal-Zanchet et al. 2014).

- Em relação ao aparelho copulador masculino, as três novas espécies podem ser facilmente distinguidas entre si e da espécie-tipo. A cavidade bulbar é ampla e ovoide em *Hausera* sp. 2, similarmente à de *H. hauseri* (Leal-Zanchet et al. 2014), mas há um divertículo direcionado posteriormente neste último, que está ausente em *Hausera* sp. 2. Contrastando com a situação na espécie-tipo e em *Hausera* sp. 2, a cavidade bulbar é estreita, ligeiramente sinuosa e alongada em *Hausera* sp. 1, em forma de pêra. Em *Hausera* sp. 3, a cavidade bulbar mostra um contorno irregular e um divertículo proximal curto e estreito.

- Em relação aos órgãos femininos, *Hausera* spp. 1 e 2 assemelham-se a *H. hauseri* por terem um ducto ovovitelino comum curto e direcionado dorso-anteriormente (Leal-Zanchet et al. 2014), enquanto *Hausera* sp. 3 tem um ducto ovovitelino comum relativamente mais longo e com uma porção proximal direcionada quase horizontalmente. Além disso, *Hausera* sp. 1 tem uma câmara lateral em forma de funil localizada dorso-anteriormente ao gonóporo, constituindo um átrio feminino, que está ausente em *H. hauseri* e nas outras duas espécies descritas aqui. Além disso, a conexão entre o átrio feminino e a bursa copulatória é representada por um canal curto em *Hausera* spp. 1 e 2, similarmente à situação em *H. hauseri* (Leal-Zanchet et al. 2014). Em contraste, *Hausera* sp. 3 mostra um canal bursal mais longo.

### *Considerações finais*

- A identificação de três novas espécies de planárias do gênero *Hausera* no estado do Rio Grande do Norte faz da região um possível hotspot de planárias troglóbias aquáticas, e amplia a sua relevância e singularidade biológica. O potencial para novas descobertas, tendo em vista o estágio inicial dos estudos, é evidente.

- Além disso, as duas novas espécies sintópicas (*Hausera* sp. 1 e sp. 2) na Furna Feia também era inesperada. A possível origem distinta, freática (*H.* sp. 1) e epicárstica (*H.* sp. 2), levanta novas possibilidades biogeográficas e evolutivas e destaca o nível extremo de endemismo para algumas espécies estritamente subterrâneas. Isso representa ainda o primeiro registro de planárias troglóbias da subordem Cavernicola vivendo em simpatria em um ponto de coleta.

- A Furna Feia está localizada em um dos poucos grandes remanescentes de Caatinga do RN. Apesar do excelente estado de conservação da superfície, o Parque Nacional da Furna Feia está localizado em um dos maiores polos de fruticultura irrigada do país e há exploração de águas subterrâneas no entorno para irrigação das plantações, bem como uso de fertilizantes químicos, corretivos de solo e pesticidas. São necessários estudos sobre a abrangência e o impacto da contaminação decorrente da provável infiltração desses poluentes no aquífero subterrâneo, bem como da possível sobre-exploração dos aquíferos, nas comunidades cavernícolas.

- Estão sendo realizados estudos para o uso turístico da Furna Feia e de outras duas cavernas na área. Dentre as ações de manejo propostas para minimizar os impactos sobre a fauna cavernícola, destacam-se a proibição de visitação nos níveis mais baixos da caverna e a implantação de estruturas para evitar pisoteio em áreas suscetíveis, evitando assoreamento. Tais ações, aliadas à restrição do número de visitantes e à presença obrigatória de guias treinados, devem efetivamente mitigar os impactos da visitação sobre sua fauna subterrânea única.

- Do ponto de vista morfológico, considerando que a presente análise confirmou a ocorrência de uma bursa copuladora em espécies de *Hausera*, foi proposta a seguinte alteração à diagnose deste gênero: Dimarcusidae sem olhos; bursa copuladora situada posteriormente ao ducto genital feminino comunicando-se com o intestino; ductos ovovitelinos sem dicotomia caudal, unindo-se para formar um ducto ovovitellino comum; testículos foliculares; ductos espermáticos penetrando separadamente no bulbo do pênis.

- Por fim, apesar de não ter sido possível o uso de ferramentas moleculares e análises filogenéticas e filogeográficas, como planejado inicialmente, o trabalho identificou três novas espécies de planárias e trouxe importantes contribuições para o conhecimento taxonômico do grupo, sua distribuição geográfica e conservação.

### **3.3. Taxonomia iterativa de crustáceos troglóbios do gênero *Potiberaba* Fišer, Zagmajster & Ferreira 2013 (Crustacea: Amphipoda) na Caatinga.**

Este subprojeto resultou na Dissertação de Mestrado do pesquisador Matheus Arthur Lúcio da Rocha. Ela foi defendida e aprovada em julho de 2021, junto ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A dissertação está disponível no repositório da UFRN, em <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/51207>, e também nos anexos a este relatório

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados do subprojeto.

#### **3.3.1. Resumo geral**

Sistemas subterrâneos podem ser encontrados em diversas formações minerais, abrigando uma fauna com diferentes estratégias de vida, que de forma conjunta, podem utilizar o ambiente subterrâneo permanentemente ou temporariamente. Dentre esses habitantes, destacam-se os troglóbios, grupo que reúne organismos que apresentam uma série de adaptações ecológicas, fisiológicas, morfológicas e comportamentais associadas ao ambiente

subterrâneo. No Brasil, a fauna troglóbia vem sendo descrita com maior intensidade nas duas últimas décadas, com a prospecção de novos locais e a integração de diferentes ferramentas analíticas. Apesar disso, a região Sudeste ainda se destaca em detrimento das demais, concentrando a maior parte dos estudos taxonômicos, ecológicos e genéticos de organismos troglóbios. No entanto, o Nordeste, em especial o estado do Rio Grande do Norte (RN), vem se destacando no conhecimento dessa fauna, com a descobertas de novas espécies de invertebrados troglóbios, como crustáceos, platelmintos e insetos. Dentre os novos organismos descritos no RN, está o gênero de anfípodes *Potiberaba*, monotípico e endêmico das cavernas da região, que durante sete anos apresentou distribuição restrita à localidade tipo. Após novas expedições, exemplares foram registrados em mais onze localidades, e cujos dados moleculares indicaram possíveis novas espécies nas cavernas da região. Até então a hipótese se sustentava apenas em delimitações utilizando um marcador mitocondrial. Dessa forma, através de uma abordagem integrada entre ferramentas moleculares (incluindo marcadores nucleares) e morfológicas, o estudo se propôs a avaliar a convergência entre as diferentes informações para sustentar a hipótese de um complexo de espécies, assim como identificar caracteres morfológicos capazes de distingui-las, e ao final, propor a descrição das novas espécies de *Potiberaba*. Através de uma abordagem iterativa entre informações morfológicas e marcadores moleculares (*cox1* e 28S), o estudo propõe a existência de cinco espécies alopátricas, das quais quatro apresentam distribuição restrita, com baixa diversidade genética e morfológica, enquanto *P. porakuara* é amplamente encontrada no sul da Formação Jandaíra. O estudo também indicou que além das divergências genéticas, as linhagens podem ser identificadas através de caracteres morfológicos com alta taxa de acerto, evidenciando que a riqueza de espécies dessa formação está subestimada.

### 3.3.2. Introdução geral

A região Oeste da Formação Jandaíra é uma das mais relevantes do Brasil do ponto de vista bioespeleológico (Bento et al. 2021), e Bento (2021) e Bento et al. (2024) indicaram que a diversidade local pode ser ainda maior quando outras

ferramentas para detecção de novas linhagens são utilizadas, como os marcadores moleculares, evidenciando a necessidade de estudos que integrem diferentes ferramentas analíticas para resoluções taxonômicas mais robustas. Nesses estudos, os autores ampliaram a distribuição conhecida do anfípode *P. porakuara* e indicaram que a espécie pode consistir em um complexo com ao menos outras quatro espécies crípticas (ver item 3.1 deste relatório).

A distribuição do gênero e de sua única espécie era restrita à localidade tipo, a caverna Três Lagos, no município de Felipe Guerra/RN. Constatou-se que *P. porakuara* e as possíveis novas espécies do gênero são encontradas em diversas cavernas da região, com *P. porakuara* sendo a mais bem distribuída, e a mais diversa do ponto de vista genético (Bento 2021, Bento et al. 2024). Os espécimes foram encontrados ocupando locais com características distintas, desde cavernas com água permanente ao longo do ano, variando em fluxo entre os períodos de chuva e seca, até cavidades que secam completamente durante o período de seca, poças, raízes e gramíneas aquáticas, variando também quanto ao tamanho populacional, onde *P. porakuara* também se diferencia pela alta abundância de indivíduos na maior parte das cavernas que habita.

Apesar da detecção de novas linhagens por meio de um marcador mitocondrial, essas não haviam sido avaliadas sob outros aspectos como diferenciação morfológica e ecológica, ou com a utilização de outros marcadores moleculares para corroborar a hipótese de um complexo de espécies.

### 3.3.3. Objetivos

Testar a hipótese de que *P. porakuara* é um complexo de espécies crípticas, por meio de uma abordagem iterativa entre informações morfológicas e genéticas das linhagens, com base nas delimitações propostas por levantada por Bento (2021) e Bento et al. (2024) e os caracteres morfológicos diagnósticos descritos por Fišer et al. (2013), avaliando se as divergências genéticas se refletem em diferenciação morfológica entre as linhagens. Associado a isso, incorporamos novas informações moleculares através da utilização de um marcador nuclear, sendo possível assim comparar as informações obtidas para cada gene e as informações morfológicas.

### 3.3.4. Destaques e principais resultados

- O estudo foi conduzido em um conjunto de cavernas calcárias localizadas na Formação Jandaíra, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Figura 25). As cavernas onde exemplares de *Potiberaba* foram coletados apresentam feições hidrológicas que vão desde poças formadas por gotejamento, através da infiltração da água superficial na formação calcária, pequenos córregos que variam de vazão dependendo do ciclo pluviométrico, interligando os sistemas subterrâneos durante a estação chuvosa, e secando total ou parcialmente na estação seca. Além disso, essas cavidades podem apresentar emaranhados de raízes que penetram a rocha alcançando a água no interior das cavernas, e resíduos vegetais em decomposição que são carregados para o interior dos sistemas durante as chuvas, e são utilizados como fonte de alimento ou abrigo por anfípodes, e outros organismos aquáticos (Figura 26).

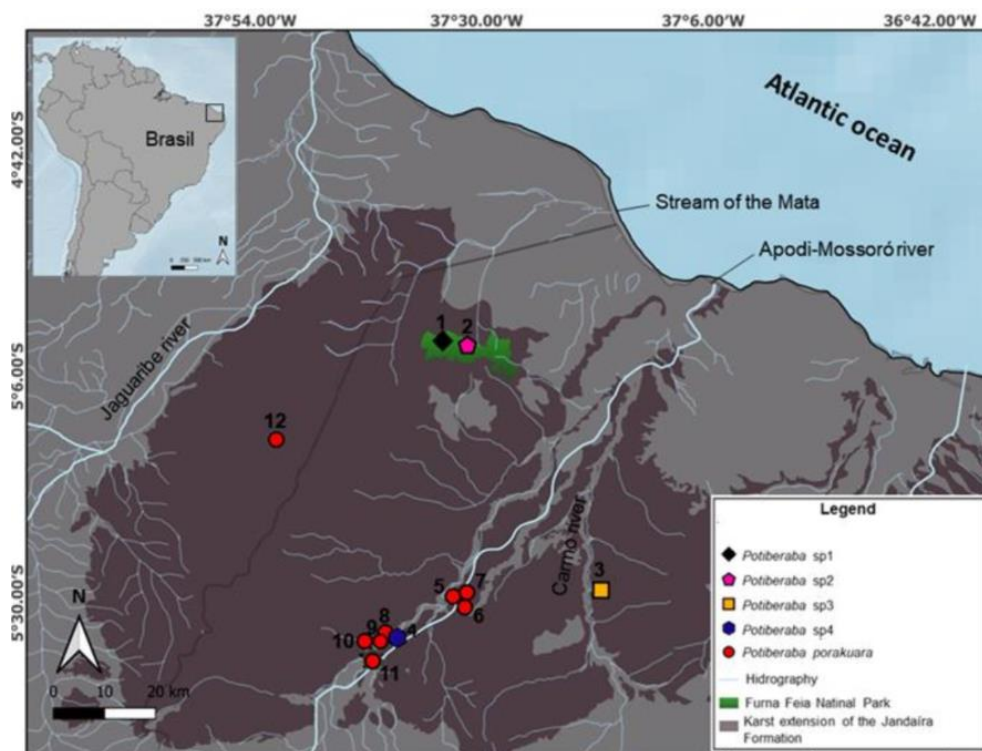


Figura 25. Localidades de *Potiberaba*. Linhas azuis claras indicam hidrografia. A área cinza escura indica a Formação Jandaíra, enquanto a verde indica os limites Parque Nacional da Furna Feia (PNFF), círculos representam locais de ocorrência de *P. porakuara*, enquanto os outros símbolos representam áreas de ocorrência das novas espécies. 1 - Caverna Furna Feia (*Potiberaba* sp. nov. 1), 2 - Caverna Pedra Lisa (*Potiberaba* sp. nov. 2), ambas no PNFF, 3 – Olho D'água da Onça (*Potiberaba* sp. nov. 3), 4 - Caverna Crotes (*Potiberaba* sp. nov. 4), 5 - Caverna Poço Feio, 6 - Caverna da Água, 7 – Olho D'água da Furna, 8 - Caverna Troglóbios, 9 - Olho D'Água do Tetéu, 10 - Caverna Boa, 11 - Gruta Três Lagos (localidade tipo), 12 – Olho D'água do Cedro.

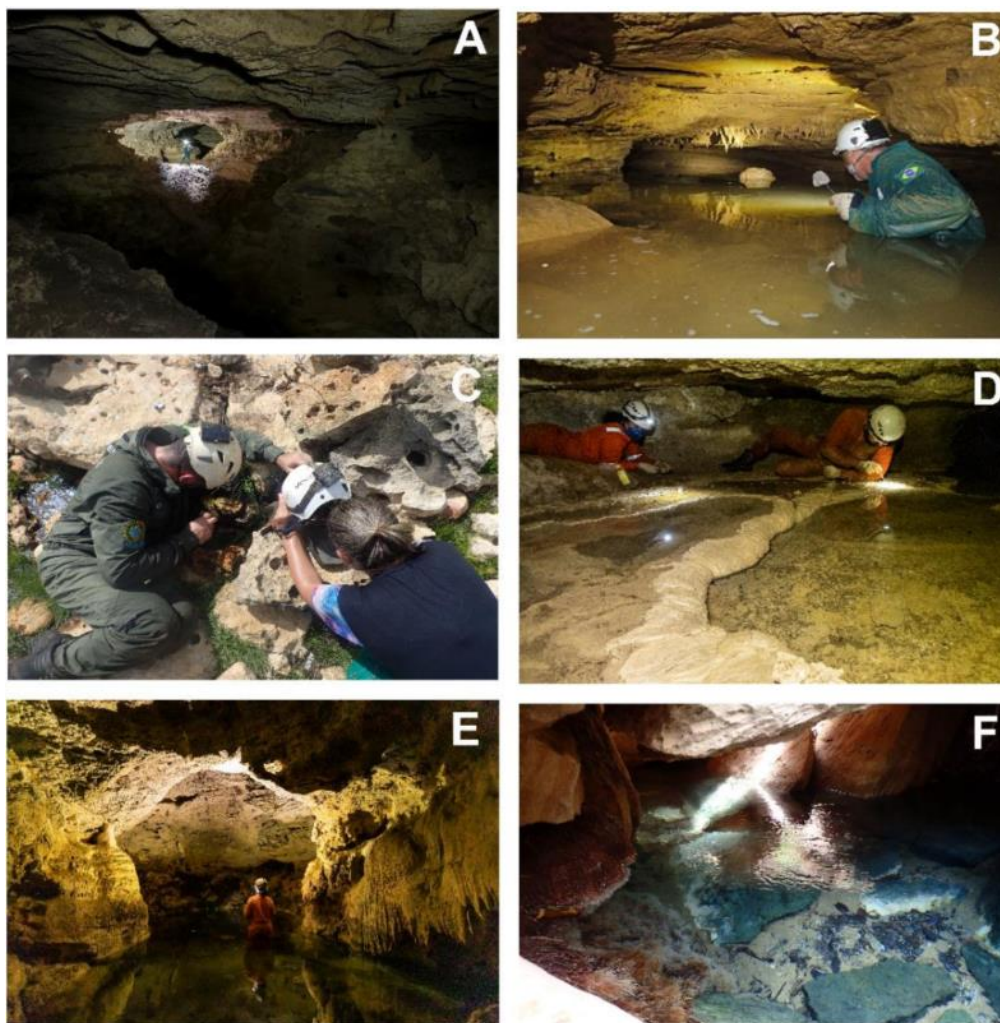


Figura 26. Localidades onde representantes do gênero *Potiberaba* foram amostrados. A- Caverna Furna Feia (*Potiberaba* sp. nov. 1), B – Caverna Pedra Lisa (*Potiberaba* sp. nov. 2), C – Olho d’água da Onça (*Potiberaba* sp. n. 3), D- Caverna Crotes (*Potiberaba* sp. nov. 4), E – Gruta Três Lagos (*Potiberaba porakuara*) e F – Olho d’água da Furna (*Potiberaba porakuara*).

- Espécimes coletados de forma ativa ou com uso de armadilhas do tipo covó, fixados em etanol absoluto e separados em cinco grupos distintos de acordo com as delimitações de linhagens de Bento (2021) e Bento et al. (2024). Posteriormente, sete exemplares de cada localidade foram dissecados sob estereomicroscópio com auxílio de alfinetes entomológicos e montados em lâminas contendo líquido de Hoyer para conservação das estruturas. As lâminas foram mantidas por 48 h em estufa a 50 °C para secagem do Hoyer e posteriormente vedadas com verniz. Por fim, as lâminas foram subdivididas em frações, tombadas e depositadas coleção de invertebrados aquáticos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte GEEFAA – UFRN, e na coleção de

fauna subterrânea da Universidade federal do Lavras, no cento de estudos em biologia subterrânea (CEBS).

- O dataset para as análises moleculares foi composto pelas mesmas sequências de Bento (2021) e Bento et al. (2024), para o gene mitocondrial *cox1*, além de sequências do marcador nuclear 28S de 35 indivíduos (Tabela 3). As análises envolveram redes de haplótipos, estruturação populacional e atribuição de indivíduos, inferências filogenéticas bayesianas e diversos métodos de delimitação de linhagens. As análises morfológicas envolveram morfometria tradicional e análises de componentes principais (PCA) e de variação canônica (CVA), com sete indivíduos para cada uma das possíveis novas espécies e 31 para *P. porakuara* (Tabela 3).

Tabela 3. Localidades onde os espécimes do gênero *Potiberaba* foram amostrados e seus respectivos números amostrais utilizados em cada análise. As siglas PCA (Análise de componentes principais) e CVA (Análise de variação canônica) correspondem às análises morfológicas. *Cox1* (Citocromo oxidase subunidade 1) e 28s aos respectivos genes mitocondriais e nucleares utilizados no estudo. 1. Caverna Furna Feia, 2. Caverna Pedra Lisa, 3. Olho d'água da Onça, 4. Caverna Crotas, 5. Poço feio, 6. Caverna da Água, 7. Olho d'água da Furna, 8. Troglóbios, 9. Olho d'água do Teteu, 10. Caverna Boa, 11. Caverna Três Lagos, 12. Olho d'água do Cedro.

Espécie	Localidade	PCA/CVA	COX1	28S
<i>Potiberaba sp. nov. 1</i>	1	7	11	7
<i>Potiberaba sp. nov. 2</i>	2	7	5	8
<i>Potiberaba sp. nov. 3</i>	3	7	6	4
<i>Potiberaba sp. nov. 4</i>	4	7	2	2
<i>Potiberaba porakuara</i>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12	31	39	35

- A partir do conjunto de dados multiloci, contendo o gene mitocondrial *cox1*, e nuclear 28S, o Geneland recuperou estruturação para cinco possíveis novas linhagens (K= 5), indicando que a hipótese de um complexo de espécies para o gênero pode ser válida. Entretanto, a similaridade entre os picos que definem o número de possíveis linhagens, (K= 4 e K= 5) (Figura 27) reforça a necessidade de mais análises para definição da quantidade de novas espécies a serem descritas.

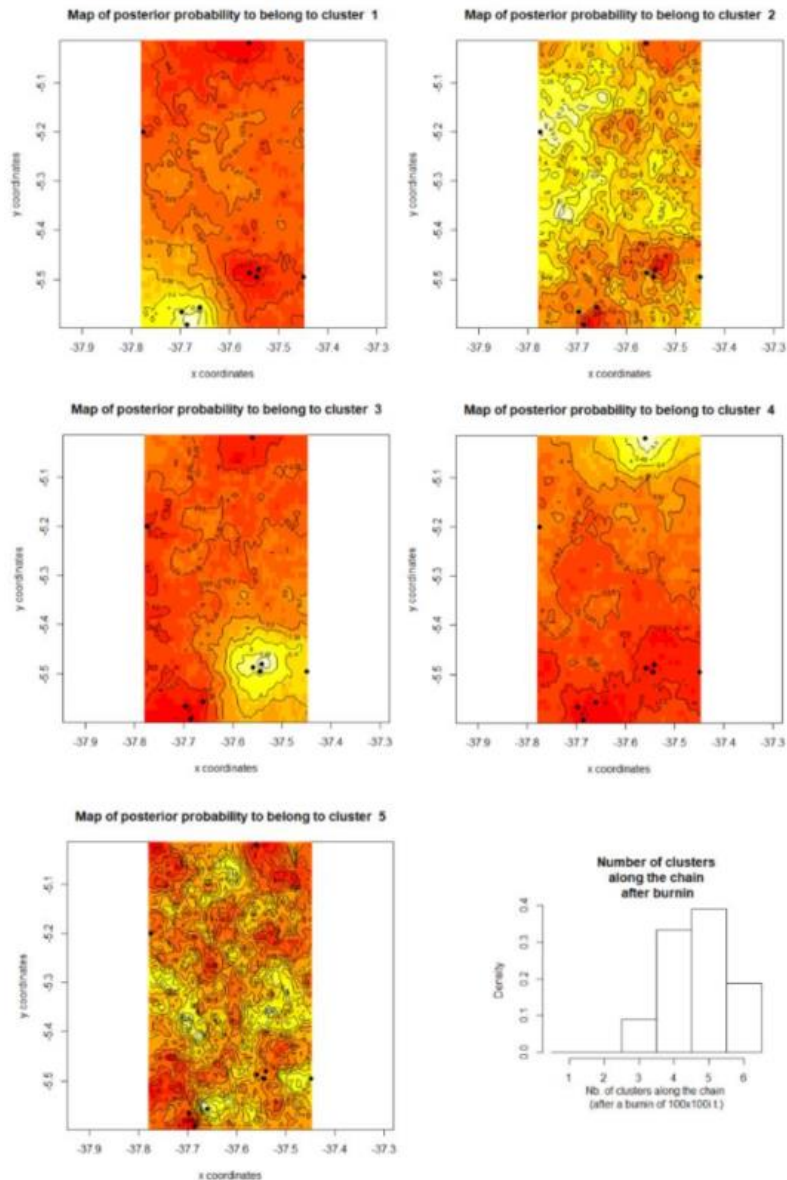


Figura 26. Mapas de probabilidade posterior para as possíveis novas linhagens de *Potiberaba*, gerados a partir de um conjunto de dados nucleares e mitocondriais. Cinco clusters distintos foram sugeridos para o conjunto de dados. Cores mais claras indicam maior probabilidade de estruturação genética. No primeiro agrupamento estão representados indivíduos de *P. porakuara*, no segundo *Potiberaba* sp. nov.1, no terceiro: *Potiberaba* sp. nov.3, no quatro: *Potiberaba* sp. nov. 2 e no quinto: *Potiberaba* sp. nov. 4.

- As filogenias e os métodos de delimitação de linhagens, realizadas para ambos os genes, geralmente foram concordantes (com exceção de *P. sp. nov. 4*, que não foi recuperada como uma linhagem separada para o gene 28S) (Figura 27)

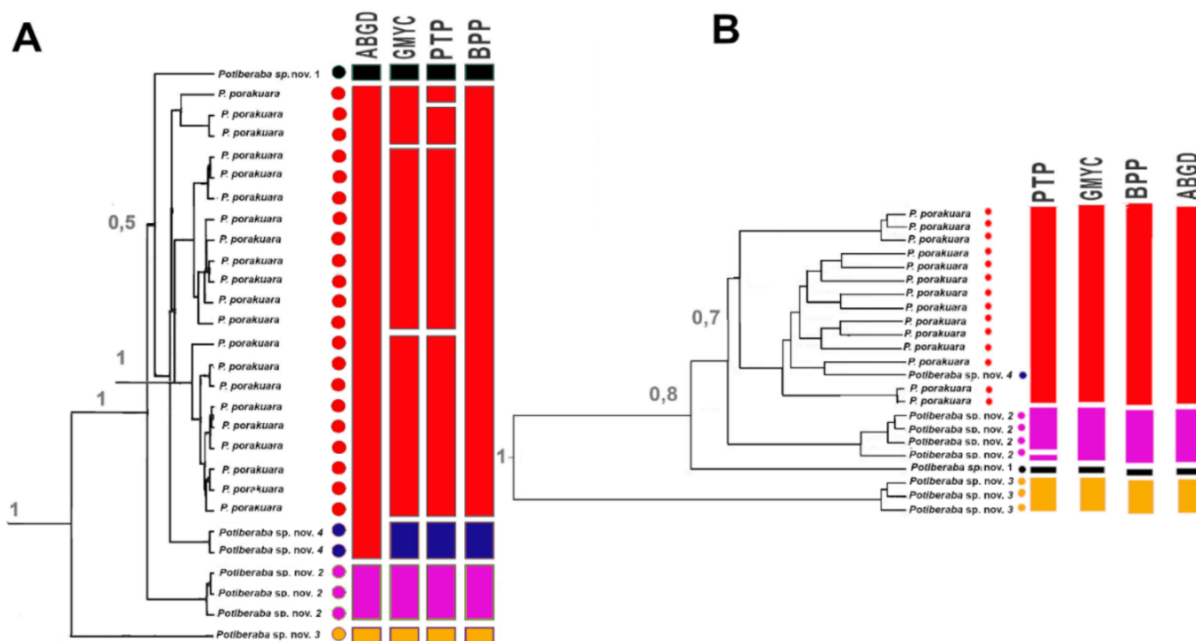


Figura 26. A - Árvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTT e BPP) para as linhagens do gênero *Potiberaba* utilizando o marcador mitocondrial *cox 1*, os círculos coloridos representam as diferentes linhagens, os valores próximos aos ramos indicam o suporte obtido para cada um deles. B - Arvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTP e BPP) para as linhagens de *Potiberaba* utilizando o marcador nuclear 28S.

- Para ambos os genes analisados, *P. porakuara* apresenta maior diversidade haplotípica em relação às outras linhagens, além de haplótipos compartilhados entre diferentes localidades. As possíveis novas espécies apresentam haplótipos únicos, sem compartilhamento com outras localidades. O gene 28S se mostrou menos diverso para todas as linhagens (Figura 27).

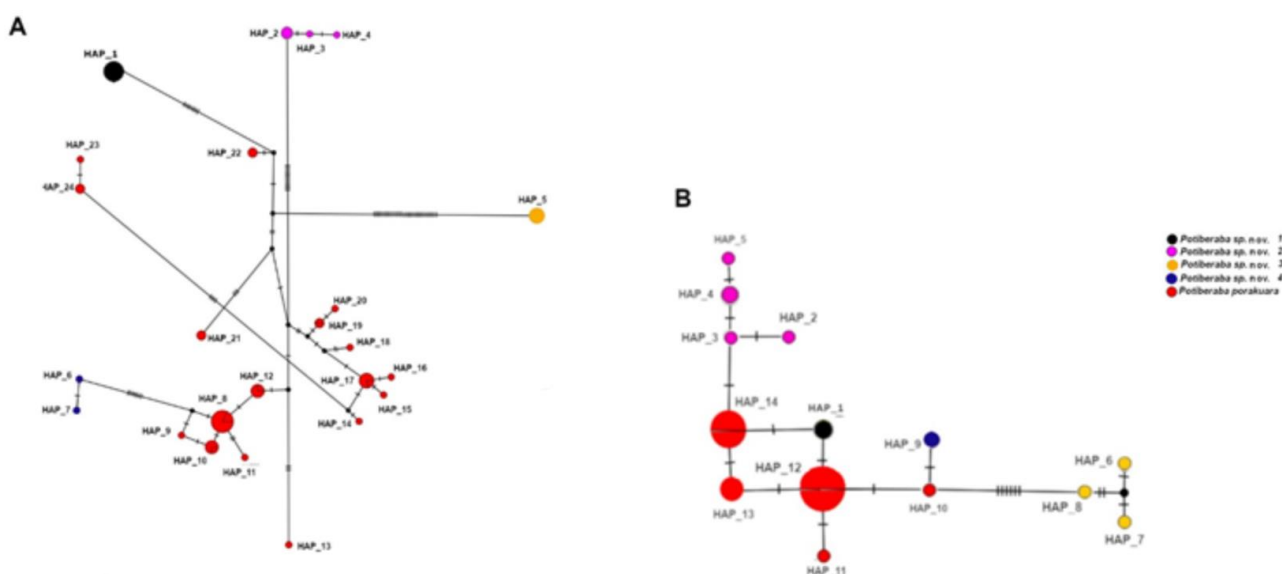


Figura 27. Redes de haplótipos para o gene mitocondrial *cox1* (A) e para o gene nuclear 28S (B).

- Os resultados obtidos com a PCA revelam tendências de separação morfológica entre as cinco linhagens, com pouco distanciamento dos pontos diante de seus centros de dispersão, assim como o baixo grau de deformação da elipse e a não interseção delas, indicando baixa variação intraespecífica em detrimento da variação interespecífica. Observando as divisões, três das quatro novas linhagem foram agrupadas opostas a *P. porakuara*, indicando diferenças mais acentuadas. Apenas *Potiberaba* sp. nov. 4 não seguiu o mesmo padrão de partição, mas ainda assim com diferenças (Figura 28A).

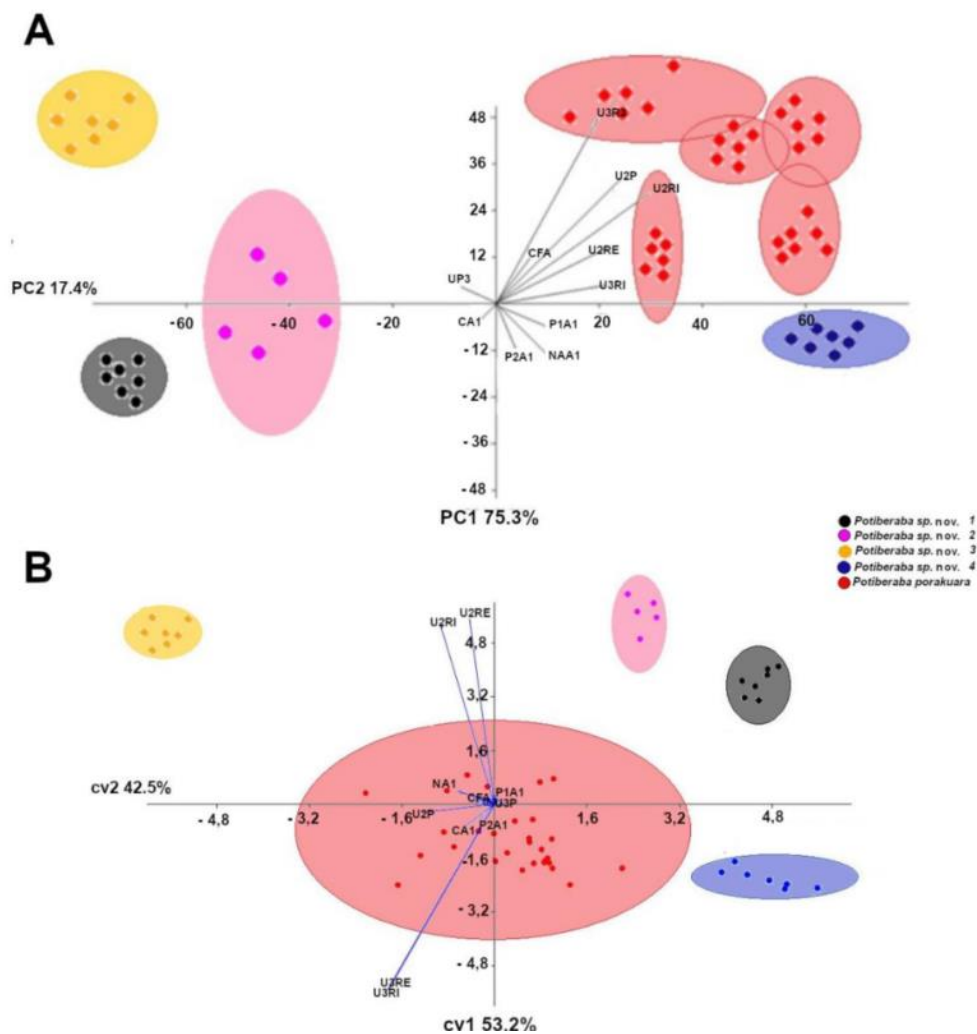


Figura 28. A- Análise de Componentes Principais (PCA) com as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas: UP3 = Pedúnculo do urópodo III, CFA = Comprimento do flagelo acessório, CA1 = Comprimento da antena I, NAA1 = Número de artículos da antena I, P1A1 = Comprimento do pedúnculo I da antena I, P2A1 = Comprimento do pedúnculo II da antena I, P3A1 = Comprimento do pedúnculo III da antena I, U3RE = Comprimento do ramo externo do urópodo III, U3RI = Comprimento do ramo interno do urópodo III, U2RE = Comprimento do ramo externo do urópodo II, U2RI = Comprimento do ramo interno do urópodo II, U2P = Comprimento do pedúnculo do urópodo. B- Análise de Variação Canônica (CVA), entre as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas aplicadas na PCA.

- O padrão de dispersão e partição observado na CVA indica, assim como na PCA, que as cinco linhagens apresentam divergência quanto aos caracteres analisados, em maior grau em estruturas como antenas e urópodes e em menor grau em estruturas como gnatópodos, gerando agrupamentos entre indivíduos co-específicos, com pouco distanciamento do centro de dispersão e baixo grau de deformação das elipses para as quatro novas linhagens, indicando baixa variação intraespecífica e maior diferenciação entre os grupos (Figura 28B). Os valores de significância intra e interespecífica reforçam a distinção morfológica entre as linhagens, com valores significativos entre os cinco grupos ( $p < 0.05$ ), e baixos ( $p > 0.05$ ) nas comparações intraespecíficas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de significância obtidos através da CVA (Análise de variação canônica) em comparações intra e interespecíficas para o conjunto de dados morfológicos de *Potiberaba*. Valores inferiores a 0.05 foram considerados significativos na análise.

	<i>P. porakuara</i>	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 1	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 2	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 3	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 4
<i>P. porakuara</i>	0	0.0366	0.0128	0.0153	0.0205
<i>Potiberaba</i> sp. nov. 1	0.0166	0	0.0310	0.0105	0.0010
<i>Potiberaba</i> sp. nov. 2	0.0122	0.0281	0	0.0101	0.0013
<i>Potiberaba</i> sp. nov. 3	0.0153	0.0015	0.0015	0	0.0010
<i>Potiberaba</i> sp. nov. 4	0.0205	0.0101	0.0120	0.0012	0

- Na dissertação foram apresentadas descrições prévias das quatro novas espécies de *Potiberaba*. Além das diagnoses e descrições prévias, são apresentadas várias imagens obtidas por micrografias eletrônicas de varredura.

### 3.3.5 Considerações finais

- As delimitações propostas por Bento (2021) e Bento et al. (2024) foram corroboradas por meio de análises moleculares multiloci e morfológicas.

- De modo geral, o estudo mostrou como a integração de diferentes ferramentas e fontes de dados pode auxiliar na resolução de questões taxonômicas, como a designação de novas espécies a partir da intercessão de dados genéticos, fenotípicos e ecológicos. A utilização da taxonomia iterativa pode auxiliar ainda na avaliação do estado de conservação das espécies, uma vez que, ao delimitadas novas espécies, podemos então identificar suas áreas de ocorrência, detectar possíveis riscos, tamanhos populacionais, dentre outros fatores utilizados na definição de ações e estratégias de conservação.

### **3.4. Revisão de *Trogolophysa* Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), com a descrição de novas espécies, Domínio da Caatinga, Brasil.**

Este subprojeto resultou na Dissertação de Mestrado da pesquisadora Paolla Gabryelle Cavalcante de Souza. Ela foi defendida e aprovada em fevereiro de 2021, junto ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A tese está disponível no repositório da UFRN, no link <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/32691>, e também consta nos anexos a este relatório.

- A dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro trata da revisão do gênero *Trogolophysa* Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), e o segundo apresenta duas novas espécies do gênero com ocorrência em cavernas no estado do Rio Grande do Norte.

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados do subprojeto.

#### 3.4.1. Resumo geral

*Trogolophysa* Mills (Paronellidae) é amplamente distribuído em regiões tropicais, com 65 espécies descritas em todo o mundo. As espécies neotropicais de *Trogolophysa* são melhor conhecidas que as afrotropicais; porém, há grandes lacunas de conhecimento para várias espécies nas duas regiões, que são reconhecidas principalmente pelos padrões de coloração, número de olhos, morfologia do complexo empodial e da fúrcula. Muitas espécies de *Trogolophysa* apresentam troglomorfismos evidentes, como redução ou ausência de olhos, corpo sem pigmentos e antenas alongadas. As cavernas possuem um papel importante para compreensão dos processos biológicos devido à sua estabilidade ambiental, mas também são relevantes para mineração brasileira, sendo a extração de calcário a principal atividade econômica nos municípios que possuem cavernas de rochas carbonáticas no Rio Grande do Norte (RN). Estudos anteriores demonstraram que *Trogolophysa* é o gênero dominante de Collembola presente em cavernas do RN. Este gênero abriga espécies com status questionáveis e o seu estudo taxonômico pode auxiliar em políticas de

conservação. Por isso, este trabalho apresenta uma revisão taxonômica com base em bibliografia de *Trogolaphysa*, com uma diagnose revisada e um resumo da morfologia geral do gênero, diagnoses detalhadas para todas as espécies, tabelas comparativas, chave de identificação para todos os táxons do gênero e descrições de duas novas espécies do gênero presentes em cavernas do RN. As espécies novas foram coletadas com aspiradores entomológicos e pincéis, fora e dentro de 10 cavernas calcárias inseridas no bioma Caatinga. A sugestão de *species inquirendae* considerou descrições taxômicas pouco informativas, características taxonômicas duvidosas e/ou localização pouco informativa ou imprecisa. Foram identificadas 14 *species inquirendae*: *T. berlandi*, *T. carpenteri*, *T. fuelleborni*, *T. ghesquieri*, *T. guacharo*, *T. hauseri*, *T. hirtipes*, *T. innominata*, *T. lamottei*, *T. maya*, *T. millsii*, *T. nigromaculata*, *T. separata* e *T. strinatii*; e foi desconsiderada a sinonímia de *T. delamarei* com *T. maya*. Foi apresentada uma síntese da morfologia geral do gênero, com as variações na quetotaxia e em suas principais estruturas. A descrição de duas novas espécies de *Trogolaphysa* amplamente distribuídas nas cavernas do RN em conjunto com a revisão do gênero proporcionam dados mais precisos no diagnóstico de espécies, aumentam o conhecimento sobre a fauna mundial de *Trogolaphysa* e podem auxiliar políticas de conservação de cavernas no RN.

### 3.4.2. Introdução geral

Colêmbolos são microartrópodes abundantes em quase todos os ambientes terrestres, estando presentes desde desertos polares até florestas tropicais quentes (Lukić 2019, Potapov et al. 2020). Eles também são encontrados em ambientes subterrâneos, sendo a sua abundância importante para a base da teia alimentar dentro de cavernas (Lukić 2019).

As cavernas representam ambientes relativamente estáveis que podem ser modelos para o estudo de processos biológicos (Mammola et al. 2020, Poulson & White 1969). No início dos anos 1960, questionamentos sobre a biologia de animais subterrâneos resultaram em estudos sobre a morfologia, ecologia, comportamento e evolução de animais cavernícolas, incluindo os Collembola (Barr 1967, Christiansen 1961, 1965, Culver & Pipan 2015).

Christiansen (1961, 1965) estudou a redução/ausência de olhos em colêmbolos cavernícolas, sua locomoção sobre superfícies úmidas ou alagadas e as diferenças morfológicas que as espécies subterrâneas poderiam apresentar. Ele cunhou o termo troglomorfismo para se referir a adaptações evolutivas regressivas ou progressivas em animais que habitam cavernas e como elas poderiam explicar a morfologia, fisiologia e o comportamento destes animais.

A família Paronellidae pertence à maior e mais diversificada ordem de Collembola, Entomobryomorpha, e possui ao menos 45 espécies troglóbias em vários gêneros, que se diversificaram dentro de cavernas (Lukić 2019). Embora muitas espécies do gênero *Trogolaphysa* Mills, 1938 estejam presentes na serapilheira do solo, algumas possuem afinidade ao ambiente subterrâneo, podendo também serem troglomórficas (Soto-Adames & Taylor 2013).

As espécies do gênero *Trogolaphysa* estão distribuídas nas regiões Neotropical e Afrotropical, e as espécies neotropicais são morfologicamente melhor caracterizadas que as afrotropicais (Nguyen & Soto-Adames 2018, Soto-Adames 2015, Soto-Adames & Taylor 2013). Porém, há grandes lacunas de conhecimento a respeito de várias espécies em ambas as regiões. As espécies normalmente são caracterizadas principalmente por padrões de coloração, número de olhos, morfologia do complexo empodial e da fúrcula, porém, esses caracteres se mostraram insuficientes para distinguir espécies de Collembola de acordo com as revisões mais recentes (Nguyen & Soto-Adames 2018).

Existem, ao menos, dois grupos de espécies com incertezas taxonômicas evidentes: um na região Afrotropical, contendo ao menos as espécies *Trogolaphysa nigromaculata* (Schött 1903) e *T. fuelleborni* (Börner 1903), e outro na região Neotropical, com ao menos as espécies *T. jataca* (Wray 1953), *T. geminata* (Mari-Mutt 1987) e *T. luquillensis* (Mari-Mutt 1987). As espécies dentro desses grupos, além de compartilharem características semelhantes, muitas vezes possuem distribuição ampla, como por exemplo *T. nigromaculata*, que pode ser encontrada do oeste ao leste da África. Essas espécies necessitam de revisões taxonômicas detalhadas, como a realizada por Mitra (2002), que a partir

da análise do material tipo de *T. nigromaculata* descreveu uma espécie nova distinta, *T. wahgreni*.

Oito espécies de *Trogolaphysa* foram descritas/registradas para o Brasil, são elas: *T. aelleni* Yoshii, 1988, *T. ernesti* Cipola & Bellini, 2017, *T. formosensis* Silva & Bellini, 2015, *T. hauseri* Yoshii, 1988, *T. hirtipes* (Handschin 1924), *T. millsii* (Arlé 1939), *T. piracurucaensis* Nunes & Bellini, 2018 e *T. tijucana* (Arlé & Guimarães 1979). Três dessas espécies, *T. aelleni*, *T. hauseri* e *T. hirtipes*, foram encontradas em cavernas da Região Sudeste com características troglomórficas evidentes, como: redução de dentes no complexo empodial, ausência de pigmentação e redução do número de olhos (Arlé 1939, Arlé & Guimarães 1979, Thibaud & Najt 1988).

Estudos anteriores em cavernas do RN demonstraram grande abundância e ampla distribuição de *Trogolaphysa* (Bento 2011, Bento et al. 2021). O gênero também possui espécies com descrições imprecisas e a revisão taxonômica de suas espécies, mesmo baseada apenas na bibliografia, pode auxiliar políticas de conservação, bem como no manejo das cavernas na área inventariada do RN, por exemplo, facilitando a estimativa do número de espécies em uma determinada área. Por isso, este trabalho se propõe a apresentar uma revisão taxonômica de *Trogolaphysa*, baseada em dados publicados, com um resumo da morfologia geral do gênero, diagnoses detalhadas para todas as suas 65 espécies, tabelas comparativas, uma chave para todos os táxons do gênero e a descrição de duas novas espécies de *Trogolaphysa* provenientes de cavernas do RN.

### 3.4.3. Objetivos

#### *Objetivo geral*

Revisar e compilar dados taxonômicos das espécies do gênero *Trogolaphysa* e inventariar e descrever espécies do gênero em cavernas da região mesoeste do Rio Grande do Norte.

#### *Objetivos específicos*

- Caracterizar e ilustrar os padrões morfológicos do gênero *Trogolaphysa*, e apresentar uma diagnose revisada para o gênero (capítulo 1);

- Apresentar dados comparativos de todas as espécies de *Trogolaphysa* através de tabelas e diagnoses específicas (capítulo 1);

- Descrever duas novas espécies de *Trogolaphysa* provenientes de cavernas da região mesoeste potiguar (capítulo 2).

3.4.4. Capítulo 1: Review of *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae)

#### *Destaques e resultados*

- De acordo com a revisão sistemática mais recente de Entomobryoidea (Zhang et al. 2019), a subfamília Paronellinae é subdividida em três tribos: Paronellinae, Cyphoderini e Bromacanthini. Os Paronellinae apresentam apêndices bem desenvolvidos, quarto segmento abdominal alongado (Abd. IV), dens lisos e retos e fórmula de sensor de tronco no segundo segmento torácico até o quinto segmento abdominal como 1, 1 | 0, 1, 1, +, 3 (Zhang et al. 2019, Bellini & Cipola 2017). Os membros de Paronellinae também compartilham escamas arredondadas e macroquetatoxia reduzida, faltando a maioria das quetas secundárias e algumas das primárias (Soto-Adames et al. 2014, Zhang et al. 2019). A quetotaxia reduzida nessas tribos pode levar à ambiguidade na identificação de homologias em alguns caracteres devido à imprecisão na determinação se as quetae primárias são deslocadas em diferentes áreas de táxons distintos ou se as quetae secundárias emergiram independentemente em diferentes linhagens, mesmo que as espécies sejam intimamente relacionadas (Soto-Adames et al. 2014). Vários estudos e revisões da quetotaxia dorsal foram feitos por Soto-Adames et al. (2013, 2014, 2015) para determinar os principais caracteres diagnósticos dos gêneros de Paronellini.

- Mills (1938) descreveu o gênero *Trogolaphysa* para conter *T. maya* Mills, 1938, uma espécie de paronelídeo de caverna sem olhos encontrada no México. Na descrição, Mills apresentou *Paronella* Schött, 1893 como o gênero mais similar a *Trogolaphysa*, da mesma forma que as comparações feitas entre *Pseudosinella* Schäffer, 1897 e *Lepidocyrtus* Bourlet, 1839, ou *Sinella* Brook, 1982 e *Entomobrya* Rondani, 1861 (ver Mills, 1938, p. 184).

- Ele indicou que *Trogolaphysa* era notavelmente similar a *Paronella*, mas desprovido de olhos. A delimitação de *Trogolaphysa* por Mills foi baseada em uma única espécie de caverna. Muitas de suas características diagnósticas para o gênero foram baseadas em troglomorfismos potenciais: ausência de olhos, pigmentos, o quarto segmento antenal com muitas cerdas modificadas e unguês com dentes internos modificados. Tais características morfológicas são comuns a várias espécies de cavernas colocadas no gênero, mas não aos táxons epiedáficos (como em Palacios-Vargas et al. 1985, Thibaud & Najt 1988; Soto-Adames & Taylor 2013, Soto-Adames 2015).

- De acordo com as revisões mais recentes, novos caracteres foram adicionados ao diagnóstico. Assim, *Trogolaphysa* é definido por ter: quarto segmento antenal anulado ou liso - mas nunca subdividido, chaeta L2 do lábio normal e não reduzido, olhos 0–8,19 Abd. IV com 3 bothriotricha, manúbrio sem espinhos, tocas com espinhos e mucro quadrado ou retangular, com 3 a 5 dentes (um diagnóstico detalhado é apresentado no tópico de resultados) (Soto-Adames & Taylor 2013, Soto-Adames 2015, Bellini & Cipola 2017, Nguyen & Soto-Adames 2018).

- *Trogolaphysa* tem uma distribuição Neotropical e Afrotropical, mas a maioria das espécies foi registrada na Região Neotropical (Nguyen & Soto-Adames 2018). A morfologia das espécies Neotropicais é mais detalhada do que as africanas, devido ao esforço de pesquisa; no entanto, há muitas lacunas no conhecimento para ambas as regiões. As espécies são diagnosticadas principalmente apenas por padrões de cores, número de olhos e complexo empodial e morfologia da furca (Nguyen & Soto-Adames 2018). O primeiro capítulo apresenta uma revisão das espécies de *Trogolaphysa*, apresentando um diagnóstico revisado e um resumo da morfologia geral do gênero, além de diagnósticos detalhados de todas as 65 espécies, tabelas comparativas e uma chave para todos os táxons de *Trogolaphysa*.

- Entre as 65 espécies de *Trogolaphysa* pesquisadas neste estudo, 14 foram aqui consideradas como *species inquirendae*: *T. berlandi*, *T. carpenteri*, *T. fuelleborni*, *T. ghesquieri*, *T. guacharo*, *T. hauseri*, *T. hirtipes*, *T. innominata*, *T.*

*lamottei*, *T. maya*, *T. millsii*, *T. nigromaculata*, *T. separata* e *T. strinatii*. A ausência de informações sobre várias características de espécies africanas impede uma comparação eficaz com espécies neotropicais. No entanto, apenas quatro espécies africanas foram classificadas como *species inquirendae*, enquanto 10 espécies neotropicais têm um status questionável. Após esta pesquisa, 51 espécies têm diagnósticos mais claros, mesmo que faltem dados importantes sobre quetotaxia.

- Das 21 espécies descritas de cavernas, 11 são cegas ou têm 2 olhos (como *T. aelleni*), e nessas espécies o dente apical dos ungues geralmente está ausente e os tenente hairs são reduzidos. Essa condição provavelmente indica que os *Trogolaphysa* das cavernas têm características adaptativas para viver nesse tipo de habitat, como redução da pigmentação corporal e dos olhos, apêndices alongados e vários tipos de sensilas nos segmentos antenais.

- Foram indicadas 14 *species inquirendae*, o que torna evidente a necessidade de uma redescrição de diversas espécies usando abordagens baseadas na taxonomia mais recente de Entomobryoidea e métodos combinando morfologia, distribuição e, se possível, dados moleculares (taxonomia integrativa). Tais métodos devem ser aplicados principalmente em complexos de espécies para tornar mais claras as identidades desses táxons. Espera-se que esta revisão e a compilação dos dados taxonômicos de *Trogolaphysa* ajudem a entender melhor os padrões morfológicos no grupo, o que pode favorecer uma melhor estimativa do número de espécies em uma área protegida, facilitar novas descrições de espécies e outros estudos comparativos dentro do gênero e entre os Paronellinae.

3.4.5. Capítulo 2: Two new species of *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae) from caves in Caatinga of Rio Grande do Norte State, Brazil

#### *Destaques e resultados*

- Estudos anteriores em cavernas do RN demonstraram uma grande abundância e riqueza de Collembola (Bento 2011, Bento et al. 2021), e tais dados

demonstram uma ampla distribuição de *Trogolaphysa* nas cavernas do RN. Este capítulo apresenta duas novas espécies que foram encontradas em cavernas do oeste do RN, adicionando à diversidade conhecida as primeiras espécies de *Trogolaphysa* registradas desta região.

- O material biológico foi coletado em cavernas do oeste do RN, localizadas nos municípios de Baraúna, Felipe Guerra e Governador Dix-sept Rosado (Figura 29). Todas as cavernas amostradas estão localizadas no bioma Caatinga, na Formação Jandaíra da Bacia Potiguar. Os espécimes foram coletados tanto em ambiente superficial (epígeo), próximo à entrada das cavernas, quanto no ambiente subterrâneo (hipógeo).

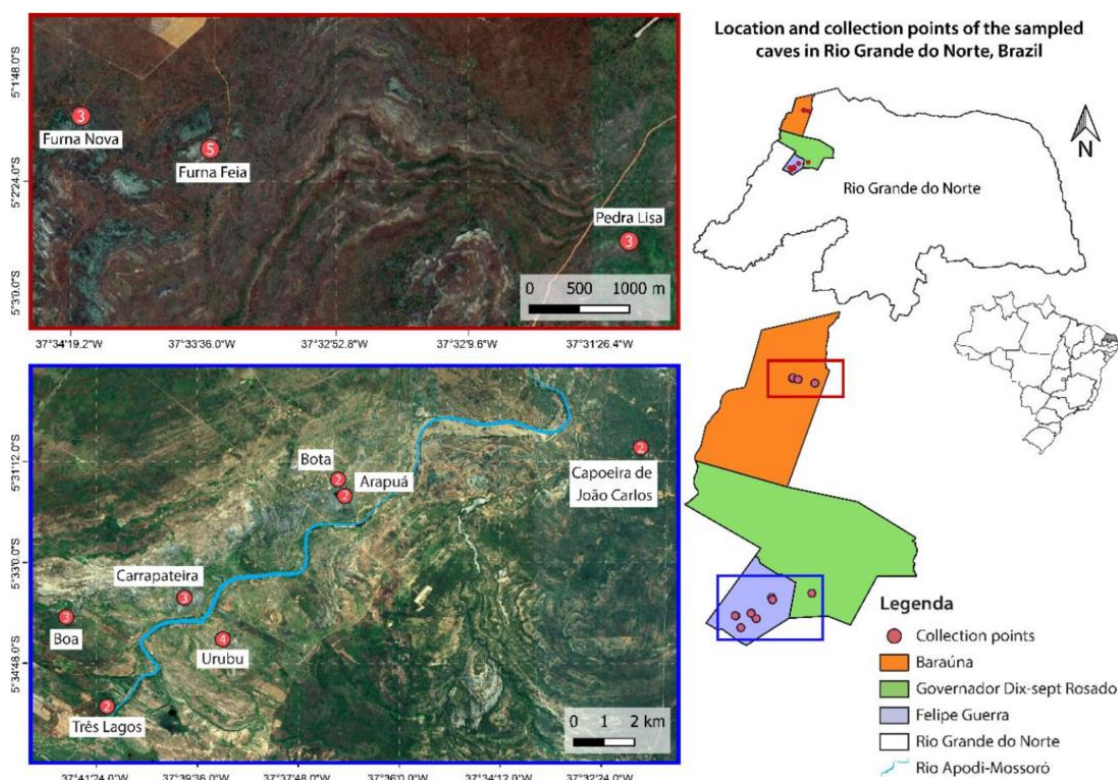


Figura 29. Cavernas amostradas no domínio Caatinga do oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. Os números dentro dos pontos vermelhos representam o total de amostras coletadas dentro e fora de cada caverna.

- A análise do material amostrado resultou na identificação de duas espécies de *Trogolaphysa*, ambas novas para a ciência.

- *Trogolaphysa* sp. nov. 1 (Figura 30) foi coletada em cavernas no oeste do RN, nas cavernas da Furna Nova e da Pedra Lisa (Parque Nacional da Furna Feia), em Baraúna/RN, e nas cavernas Boa e Três Lagos, no município de Felipe Guerra/RN.



Figura 30. *Trogolaphysa* sp. nov. 1, habitus, vista lateral, espécime em etanol (100%).



Figura 31. *Trogolaphysa* sp. nov. 2, habitus, vista lateral, espécime em etanol (100%).

- *Trogolaphysa* sp. nov. 2 (Figura 31) é encontrada nas cavernas do Urubu, Carrapateira, Bota e Arapuá, no município de Felipe Guerra/RN, e na caverna da Capoeira de João Carlos, no município de Governador Dix-Sept Rosado/RN. A nova espécie foi frequentemente encontrada perto de poças d'água, sob e sobre pedras, sobre guano e solo das cavernas.

- Apesar de suas grandes populações dentro de cavernas, ambas as novas espécies de *Trogolaphysa* não mostram troglomorfismos claros, como redução da pigmentação e dos olhos, apêndices alongados ou alterações nos complexos empodiais; no entanto, elas são provavelmente troglófilos, pois foram encontrados principalmente dentro de cavernas. Com base nessa observação e nas descrições das espécies do gênero em todo o mundo, pode-se sugerir que *Trogolaphysa* tem uma associação biológica com o ambiente subterrâneo, uma vez que cerca de 40% das espécies foram coletadas dentro de cavernas, independentemente de sua morfologia (Palacios-Vargas et al. 1985, Soto-Adames & Taylor 2013, Soto-Adames 2015).

- A falta de troglomorfismos claros em *Trogolaphysa* sp. nov. 1 e *Trogolaphysa* sp. nov. 2 talvez possa ser explicada por uma colonização recente do habitat subterrâneo por suas populações, considerando uma escala de tempo geológica. Outra hipótese é o fluxo genético entre populações superficiais e subterrâneas, que pode ocorrer se a população da superfície migrar ativamente das cavernas durante o dia. Essa migração de Collembola ao longo do dia para habitats subterrâneos rasos é possível por meio de rachaduras e fissuras superficiais (também conhecidas como Milieu Souterrain Superficiel - MSS), que geralmente ocorrem quando as condições do ambiente superficial não são favoráveis (Rendoš et al. 2020). As cavernas da Caatinga, assim como o MSS, podem atuar como refúgios climáticos para colêmbolos, especialmente os troglófilos. Talvez o habitat subterrâneo na Caatinga possa ser considerado um oásis no deserto para invertebrados que precisam escapar do calor e da exposição ao sol. No entanto, estudos mais aprofundados sobre a ecologia e genética das populações cavernícolas devem ser conduzidos para melhor

compreender a dinâmica e evolução das linhagens de *Trogolaphysa* no domínio Caatinga.

- As duas novas espécies descritas aumentam o número de espécies nominais de *Trogolaphysa* registradas no Brasil para dez. *Trogolaphysa* sp. nov. 1 é protegida em pelo menos duas cavernas dentro do Parque Nacional Furna Feia, e a descrição da espécie pode fornecer suporte adicional para o plano de gestão ambiental do parque. Entender o habitat subterrâneo e a distribuição das espécies é importante para promover ações de conservação em ambientes já afetados por atividades humanas, como a Caatinga.

#### 3.4.6 Considerações finais

Apesar de não ter sido possível o uso de ferramentas moleculares e análises filogenéticas e filogeográficas, como planejado inicialmente, o trabalho identificou duas novas espécies de colêmbolos e trouxe importantes contribuições para o conhecimento taxonômico do grupo, sua distribuição geográfica e conservação.

### **3.5. Filogeografia do grilo *Endecous potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 (Orthoptera, Phalangopsidae): Investigação de linhagens crípticas em cavernas na Formação Jandaíra.**

Este subprojeto resultou na Dissertação de mestrado da pesquisadora Nathália Kaluana Rodrigues da Costa. Ela foi defendida e aprovada em agosto de 2022, junto ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução, linha de pesquisa Padrões e Processos Evolutivos, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A tese está disponível no repositório digital da UFRN, no link <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/52101>, e também consta nos anexos a este relatório. A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados do subprojeto.

### 3.5.1. Resumo geral

Os grilos de cavernas da família Phalangopsidae são pouco estudados e possuem baixa capacidade de dispersão e ampla distribuição, o que os tornam interessantes para investigações filogenéticas e filogeográficas. Dentro desta família está o gênero *Endecous*, que foi subdividido em três subgêneros com base em caracteres morfológicos e possui a maior parte de suas localidades-tipos em cavernas. Atualmente, toda pesquisa taxonômica envolvendo o gênero usa de caracteres morfológicos, bioacústicos e citogenéticos. Aqui, reconstruímos a filogenia e filogeografia de *E. potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 com base em 151 sequências parciais do gene COX-1 com 571 pb para 21 localidades diferentes. Filogenias moleculares foram reconstruídas usando inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, e três abordagens (ABGD, PTP e GMYC) foram utilizadas para delimitação de linhagens. Foi feita uma Análise Bayesiana da Estrutura da População utilizando o BAPS. Adicionalmente, foram selecionados alguns espécimes para extração do complexo fálico e análise dos caracteres morfológicos com base no artigo de descrição. Foram utilizadas também algumas amostras acústicas para análise. A análise bayesiana sugeriu dois clados, aqui tratadas como duas possíveis espécies, o que foi apoiado por duas das três análises de delimitação, exceto o PTP que seguiu a divisão feita pela Máxima Verossimilhança em três clados. A estimativa do tempo de divergência sugere que essa especiação ocorreu há 7.40 Ma (95% de HPD 13.80-3.75 Ma). A divergência inicial entre as espécies possivelmente está correlacionada com um mecanismo de vicariância após o surgimento da calha que daria origem ao rio Apodi-Mossoró, no período entre o Mioceno e o Quaternário. Com a diminuição da umidade, essas espécies teriam se dispersado para cavernas com tempos de divergência recentes entre os grupos. Observamos uma estase morfológica, talvez fruto de uma seleção estabilizadora devido ao conservadorismo de nicho.

### 3.5.2. Introdução geral

Embora a espécie seja umas das mais importantes unidades da biologia, defini-la e reconhecê-la é uma questão controversa (Mayr, 2005). De Queiroz (2007) propôs um conceito unificado de espécie tratando-as como linhagens de

metapopulações que evoluem separadamente de outras linhagens. Nesse trabalho, o autor fez uma distinção entre conceito e critério de espécies, indicando que o critério unificado que ele propunha continha a mesma ideia geral de outros conceitos. Para ele, a controvérsia sobre espécies reside não no conceito em si, mas no critério operacional para identificá-las. Assim, ele sugeriu que muitos dos antigos conceitos de espécie (eg. morfológico, ecológico, acústico etc.) na verdade estão centrados em critérios e não em conceitos de espécie.

Ainda hoje, uma parte significativa dos taxonomistas se ancora em caracteres morfológicos para definir e validar espécies. Entretanto, nos últimos 20 anos, análises moleculares têm sido a grande fonte de evidência para novas espécies, algumas morfológicamente distintas e outras não (crípticas). Assim, basear-se somente em variações de caracteres morfológicos para delimitar espécies pode subestimar a real riqueza e limitar mecanismos e processos por trás da especiação. Nesse contexto, Yeates et al. (2010) sugere o uso da taxonomia integrativa como método de integrar todas as fontes de dados disponíveis (e.g: morfologia, moleculares, acústicas, ecológicas) para delimitar os limites de uma espécie. Com o avanço das pesquisas em evidências genéticas, o número de espécies crípticas descritas com base em análises moleculares cresceu abruptamente (Марин 2020, Tahami et. al 2021, Zhu et. al 2022).

O gênero *Endecous* foi proposto pelo naturalista Henri Louis Frédéric de Saussure em 1878, a partir da descrição da primeira espécie, *Endecous (Endecous) arachnopsis*. Gorochov (2014) dividiu o grupo em três subgêneros de acordo com a variação apresentada na genitália do macho (esclerito fállico) e a tégmina direita: *Endecous (Notendecous)*, *Endecous (Pedroecous)* e *Endecous (Endecous)*. *Endecous (Notendecous)* possui esclerito fállico mais alongado (formato retangular), *E. Pedroecous* tem um esclerito mais curto (formato de um quadrado achatado) e *E. Endecous* tem um esclerito padrão (formato quadrado), quando comparados em vista lateral (Souza Dias et al. 2014, Castro-Souza et al. 2017; Castro-Souza et al. 2020). Atualmente, existem 21 espécies descritas para o gênero e, destas, 15 estão ocorrem no Brasil (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020, Castro-Souza, Junta & Ferreira 2020). Estas são diferenciadas principalmente pela

morfologia do complexo fálico, além do cariótipo e características bioacústicas (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020; Castro-Souza, Junta & Ferreira 2020).

Das 15 espécies encontradas no Brasil, 11 possuem localidade-tipo em ambientes subterrâneos (*E. cavernicolus*, *E. peruassuensis*, *E. betariensis*, *E. alejomesai*, *E. ubajarensis*, *E. potiguar*, *E. apterus*, *E. bahiensis*, *E. painenesis*, *E. didymus* e *E. troglobius*). Destas, somente três são consideradas troglóbias: *E. (P.) apterus* (Souza-Dias et al., 2014), *E. (E.) peruassuensis* (Bolfaniri & Bichuette, 2015) e *E. (E.) troglobius* (Castro-Souza et al. 2020).

Em 2017, Castro-Souza e colaboradores descreveram a primeira espécie de *Endecous* no Rio Grande do Norte (com localidade-tipo na caverna da Carrapateira, no município de Felipe Guerra), *Endecous (Notendecous) potiguar*. Nesse trabalho, os autores defendem que *E. potiguar* possui distribuição ampla em 15 cavernas nos municípios de Apodi, Baraúna, Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado. As análises morfológicas propostas pelos autores mostraram que os indivíduos possuem antenas mais alongadas, palpômeros esbranquiçados, asas não funcionais em adultos e olhos pretos com pequenas manchas despigmentadas. Além disso, sugeriram que tais características podem ser sinais de especiação e de adaptação ao ambiente hipógeo, e levantaram dúvidas sobre o status de possível espécie troglóbia.

As características morfológicas indicadoras de adaptação ao ambiente subterrâneo, associadas à distribuição relativamente ampla para uma espécie cavernícola, podem indicar que há várias linhagens de *E. potiguar* ao longo de sua distribuição. Apesar da ampla distribuição, existem cavernas que ainda não são devidamente protegidas, e nada garante que a redução dos habitats preferenciais de *Endecous* não venha a causar um grande desequilíbrio ecológico e tornar outras espécies vulneráveis, e mesmo levá-las à extinção (Castro-Souza et al. 2017).

### 3.5.3. Objetivos

#### *Objetivo geral*

- Avaliar se existem linhagens crípticas de *Endecous potiguar*, por meio de análises filogeográficas, bioacústicas e morfológicas.

#### *Objetivos específicos*

- Investigar a existência de estruturação genética intraespecífica;
- Avaliar a existência de diversidade críptica;
- Testar a existência de espécies crípticas com base em taxonomia integrativa, com dados moleculares, morfológicos e bioacústicos;
- Avaliar o tempo de divergência e a correspondência espacial da estrutura genética, relacionando com elementos da paisagem como cavernas e hidrografia.

### 3.5.4. Destaques e resultados

- Os espécimes utilizados foram coletados em 22 cavernas que abrangem praticamente toda a distribuição geográfica conhecida da espécie (Castro-Souza et al. 2017, Bento et. al 2021). Tais cavernas estão inseridas na Formação Jandaíra e estão localizadas nos municípios de Baraúna (incluindo cavernas no Parque Nacional da Fuma Feia), Mossoró, Governador Dix-Sept Rosado, Felipe Guerra e Apodi, no Rio Grande do Norte, e em Quixeré, no Ceará (Figura 32).

- Os indivíduos foram coletados manualmente por meio de busca ativa, fixados em etanol absoluto (99,5% P.A) e armazenados sob refrigeração (-20°C). As etapas de extração, amplificação, PCR e sequenciamento foram realizadas no Instituto Tecnológico Vale-Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS).

- As análises moleculares envolveram redes de haplótipos, estruturação populacional e atribuição de indivíduos, demografia e diversidade genética, inferências filogenéticas bayesianas (IB) e de máxima verossimilhança (MV) e diversos métodos de delimitação de linhagens. A análise dos dados morfológicos foi realizada a partir da morfologia da genitália de sete indivíduos machos adultos de localidades distintas de acordo com os resultados preliminares das análises

moleculares. As análises bioacústicas foram baseadas na gravação, em ambiente controlado, de machos e fêmeas adultos capturados nas diferentes cavernas onde a espécie ocorre.

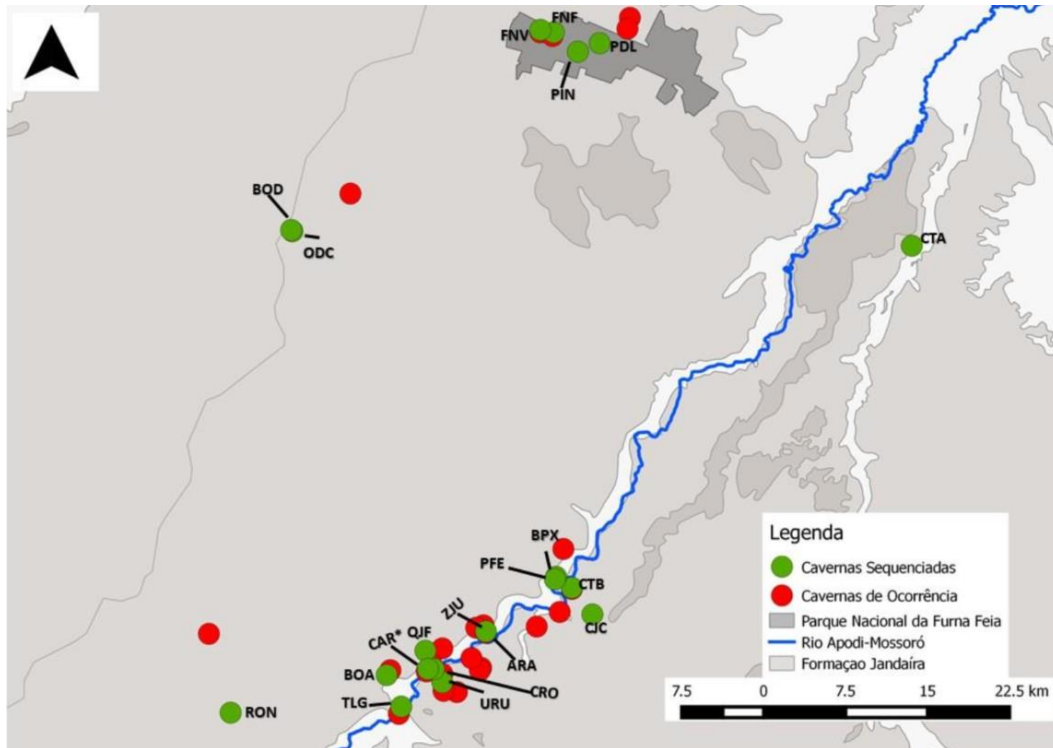


Figura 32. Localização das cavernas com registros de ocorrência de *Endecous potiguar*. Em verde, são representadas as cavernas com indivíduos sequenciados no atual trabalho e em vermelho as que não foram sequenciadas, mas possuem ocorrência.

- O presente trabalho também registrou novas ocorrências e ampliou a área de distribuição do táxon estudado. A partir de sequências parciais do gene mitocondrial *cox-1* com 571 pares de bases de 151 indivíduos coletados em 21 localidades diferentes, foram identificados 36 diferentes haplótipos (Figura 33), incluindo seis compartilhados entre indivíduos de localidades próximas.

- Com altos valores de probabilidades posteriores, a IB apontou dois clados para o táxon. Todavia, essa divisão não teve suporte na MV, que separou os táxons em três clados, e nem em dois dos três métodos de delimitação de linhagens. Isso corrobora duas linhagens, incluindo uma provável nova espécie críptica em *E. potiguar*. De acordo com a IB, essa bifurcação ocorreu há aproximadamente 7.40 milhões de anos atrás (95% HPD 13.80-3.75 Ma) (Figura 34).

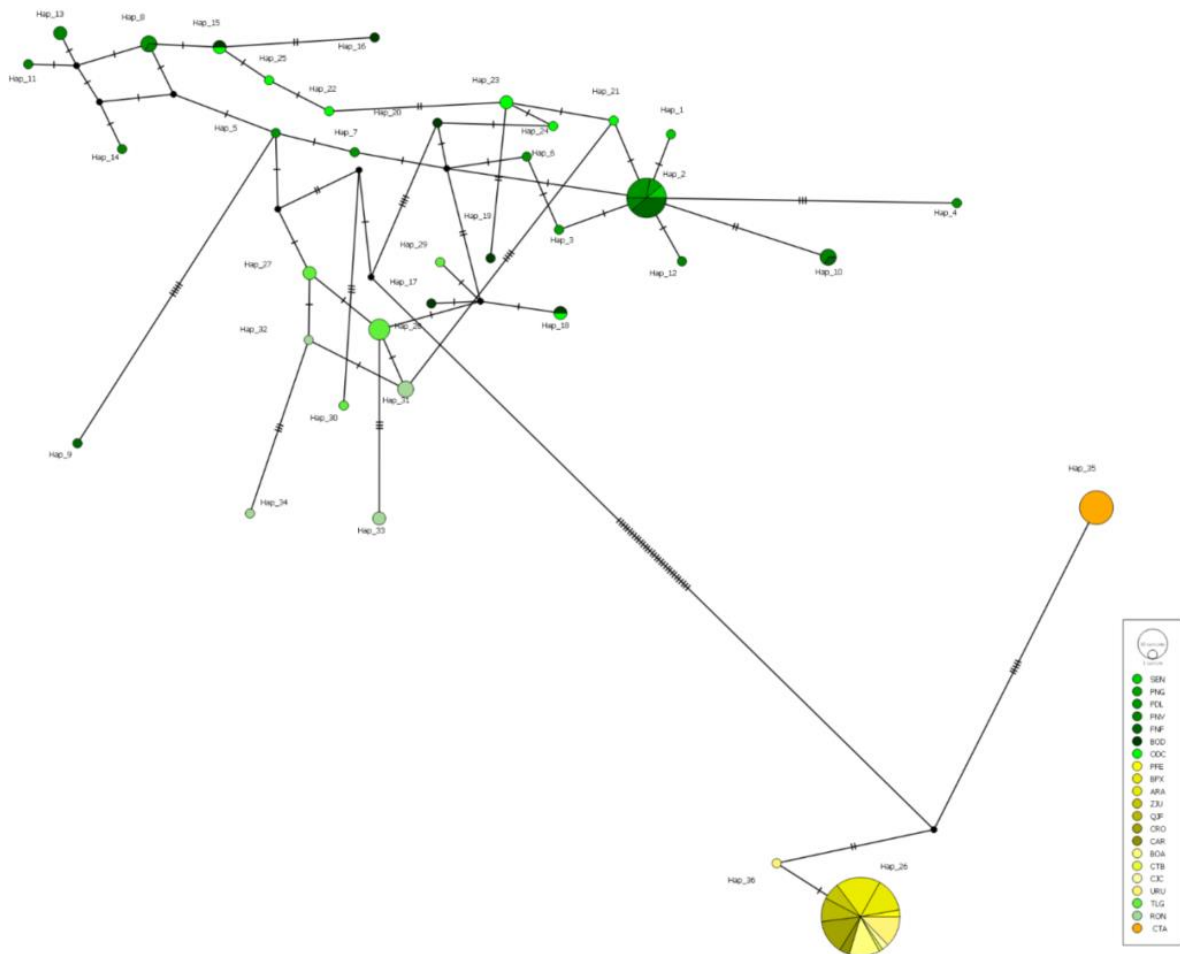


Figura 33. Rede de haplótipos do gene *cox-1*. As marcas de hachura entre os pontos pretos representam os passos mutacionais, a área do círculo dos haplótipos é proporcional ao número de indivíduos. As cores identificam as diferentes localidades.

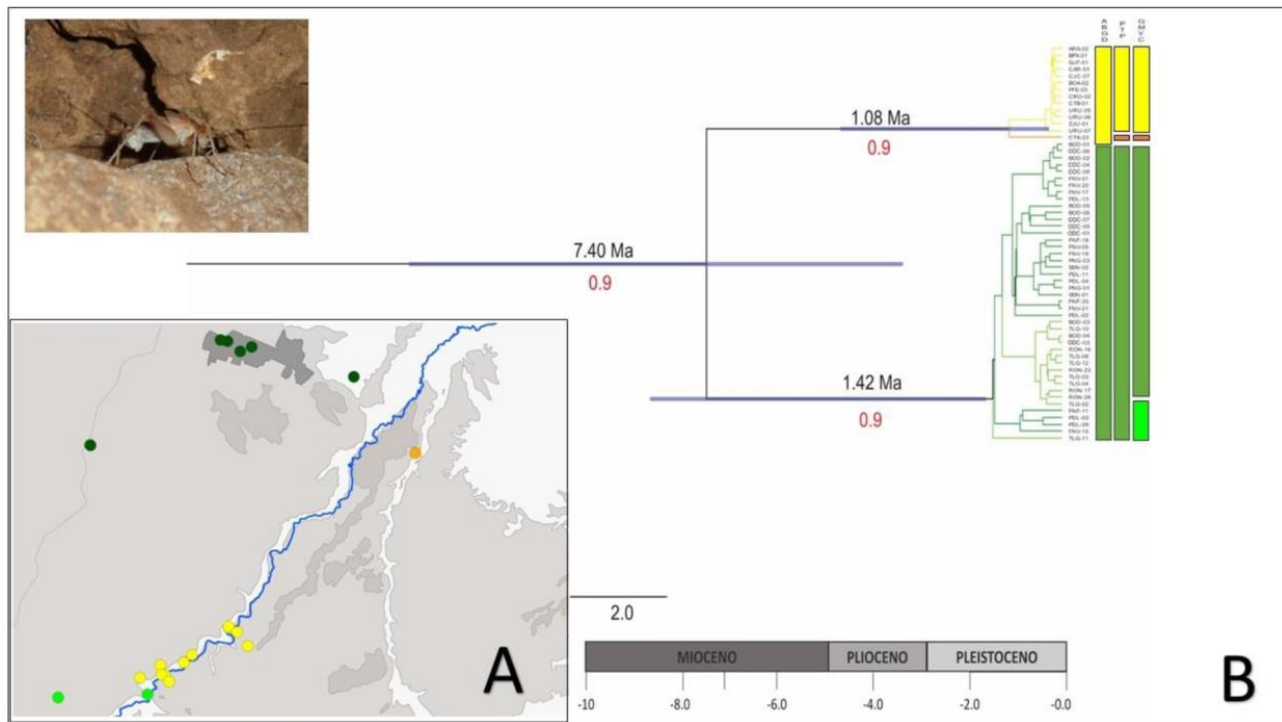


Figura 34. localização das cavernas (A). Árvore filogenética de consenso resultantes da inferência bayesiana com relógio molecular (B).

- Esse padrão foi corroborado pela inferência bayesiana de estrutura genética de populações (BAPS), que indicou 4 agrupamentos populacionais (Figura 35). O agrupamento em verde escuro inclui indivíduos coletados em cavernas no limite noroeste da distribuição da espécie (incluindo cavernas no Parque Nacional da Fuma Feia), o verde claro em sua maioria inclui indivíduos de duas localidades no limite sul da distribuição, o amarelo inclui as cavernas às margens do rio Apodi-Mossoró e o laranja exclusivamente indivíduo da caverna do Trinta, em Mossoró, que é isolada no limite leste da distribuição da espécie.

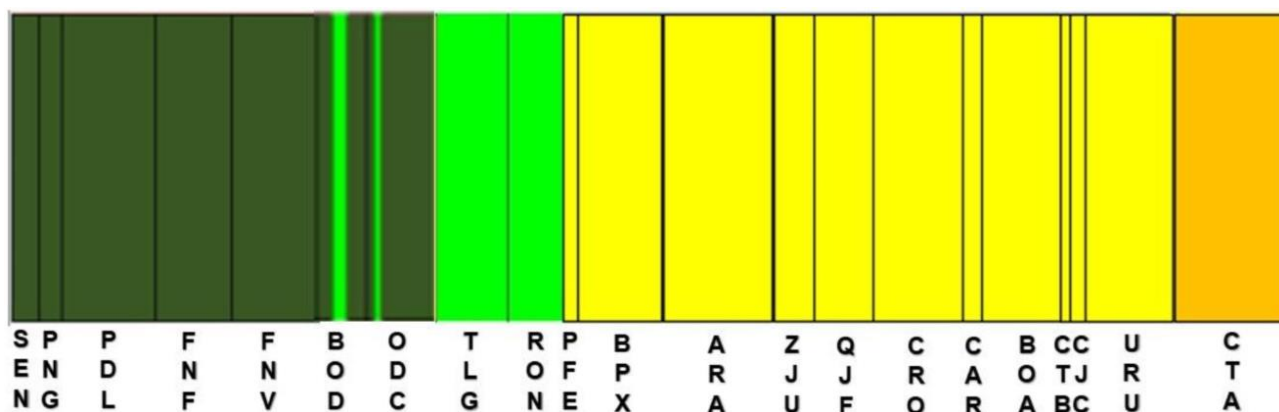


Figura 35. Atribuição de indivíduos realizada pelo BAPS, sugerindo quatro populações para *E. potiguar*.

- Os resultados do BAPS sugerem quatro populações, no entanto as filogenias, métodos de delimitação de linhagens e as distâncias genéticas analisadas sugerem duas linhagens principais com 8% de distância genética entre elas (enquanto as distâncias intraespecíficas ficam abaixo de 0,1%). Assim, *E. potiguar* corresponde à linhagem com distribuição nas localidades identificadas em amarelo e laranja nas figuras anteriores, já que a localidade-tipo, a caverna da Carrapateira, em Felipe Guerra/RN, está entre elas. Os indivíduos com ocorrência nas localidades em verde corresponderiam a uma nova espécie.

- A análise de 14 variáveis morfológicas nas imagens do esclerito fálico indicou variações sutis em somente duas delas. Essas diferenças não corresponderam aos agrupamentos populacionais visto nas análises moleculares, sugerindo uma diversidade críptica nas linhagens de *E. potiguar*. As diferenças encontradas podem ainda ser devido às variações intraespecíficas ou posicionamento da genitália no momento da foto, sugerindo uma ampla conservação morfológica dos espécimes.

- As análises bioacústicas também não concordaram com as delimitações moleculares, mas isso pode ser devido a uma quantidade pequena de cavernas com indivíduos gravados e efetivamente utilizados.

### 3.5.5 Considerações finais

*E. potiguar* apresenta uma diversidade molecular significativa. Todavia, morfologicamente as linhagens apresentaram apenas diferenças muito sutis e que não sustentam os clados vistos nas análises moleculares. Além disso, acusticamente, os clados não diferiram em nenhum dos caracteres analisados. Neste estudo, não foram detectadas diferenças morfológicas ou acústicas significativas entre as linhagens genéticas identificadas. Todavia, a distância genética encontrada corresponde a mais que o dobro do que se costuma usar como limite interespecífico de insetos (Bianchi & Gonçalves 2021), o que indica um caso típico de espécies crípticas.

Estudos moleculares podem nos revelar variações significativas quando outros caracteres (e.g. morfológicos e acústicos) não expressam tal diversidade. Tais informações são de suma importância principalmente no caso de espécies pouco estudadas. Por meio desses estudos é possível contribuir para conservação dessas linhagens, revelando a diversidade críptica e elucidando sua distribuição, permitindo assim o direcionamento de ações visando à conservação, por exemplo, de cavernas que abrigam linhagens isoladas (como é o caso da caverna do Trinta, em Mossoró/RN).

Para a elucidação do status de espécie da principal linhagem aqui identificada, é necessário o aprofundamento dos estudos moleculares (por meio da inclusão de marcadores nucleares, por exemplo), bem como dos estudos morfológicos e bioacústicos mais amplos. Além disso, recomenda-se a realização de estudos voltados a uma maior compreensão da história da paisagem onde as cavernas com ocorrência de *Endecous potiguar* estão inseridas, o que pode esclarecer a atual distribuição das diferentes linhagens. No entanto, a necessidade de aprofundamento dos estudos não pode ser usada como justificativa para o adiamento de ações voltadas à conservação da grande variabilidade genética aqui encontrada.



### 3.6.1. Resumo geral

A maioria das cavernas do estado do Rio Grande do Norte (RN) está inserida nos calcários da Formação Jandaíra, na Caatinga. Essa região é considerada de alta relevância bioespeleológica, uma vez que apresenta elevada riqueza e concentração de espécies adaptadas aos ambientes subterrâneos. Dentre elas, estão os aracnídeos da ordem Schizomida, também conhecidos como escorpião-chicote-de-cauda-curta, cuja espécie *Rowlandius potiguar* foi registrada em 30 cavernas no oeste do RN. Essa ampla distribuição pode sugerir que se trata de uma espécie troglófila que eventualmente colonizou cavernas ao longo da Formação Jandaíra, ou um complexo de espécies troglóbias, como detectado em outros invertebrados da região. Para responder a essa questão através de uma abordagem filogeográfica, coletamos esses esquizômidos em 12 cavernas de sua distribuição conhecida, incluindo na caverna Casa de Pedra, que é o registro mais ao sul de *Rowlandius* no RN, na formação Jucurutu. Também registramos 14 novas ocorrências para o grupo na região. Análises filogeográficas e filogenéticas, usando os marcadores moleculares mitocondrial citocromo C oxidase I e nuclear rDNA 28S, indicaram que *R. potiguar* se trata de um complexo de espécies, com duas possíveis espécies novas, uma restrita à caverna Casa de Pedra (*Rowlandius* sp.n.2), e outra sustentada por dados morfológicos da genitália interna feminina e do formato do flagelo terminal no final do abdome dos machos, e que ocorre em treze cavernas (*Rowlandius* sp.n.1). Além disso, as análises filogeográficas detectaram uma estruturação de cinco populações para *R. potiguar* e de três para *Rowlandius* sp.n.1. Essas linhagens ocorrem em alopatria e não apresentaram um padrão definido de distribuição. Também destacamos que as espécies identificadas no complexo estão protegidas em áreas de conservação, como o Parque Nacional da Fuma Feia, em Baraúna, e o Monumento Natural Estadual Cavernas de Martins, em Martins/RN. No entanto, é preciso ressaltar que existem populações vulneráveis nos municípios de Governador Dix-Sept Rosado e Felipe Guerra. Com isso, propomos a atualização da distribuição geográfica de *R. potiguar*, ao passo que descobrimos que a riqueza do gênero *Rowlandius* na Caatinga é maior que se imaginava originalmente.

### 3.6.2. Introdução geral

Entre as espécies que possuem os ambientes subterrâneos como um de seus habitats, estão os aracnídeos da ordem Schizomida, conhecidos como escorpiões-chicote-de-cauda-curta, com 372 espécies descritas, a maioria da região Neotropical (World Schizomida Catalog 2022). Eles possuem tamanho pequeno (entre 1 e 5 mm de comprimento), apresentam pedipalpos raptorais que utilizam para predação de pequenos invertebrados, e primeiro par de pernas mais alongado e com função sensorial. Além disso, o flagelo no final do abdome em machos é uma característica diagnóstica entre espécies. Também apresentam cutícula relativamente fina, o que os tornam sensíveis à desidratação. Logo, o ambiente hipógeo é adequado para esses aracnídeos (Reddell & Cokendolpher 1995, Oliveira & Ferreira 2014).

O gênero *Rowlandius* Reddell & Cokendolpher, 1995 apresenta um pouco mais de 60 espécies descritas (Reddell e Cokendolpher 1995, Armas 2002, Teruel et al. 2012, Santos et al. 2013, Giupponi et al. 2016), a maioria encontrada nas ilhas do Caribe, em florestas tropicais e cavernas. Na América do Sul, o gênero é representado por *R. arduus* Armas, Villareal & Colmenares, 2009 da floresta tropical na Venezuela (Armas et al. 2009), *R. sul* Cokendolpher & Reddell, 2000 da floresta na Amazônia Oriental no Brasil (Cokendolpher & Reddell 2000), *R. linsduarteae* Santos, Dias, Brescovit & Santos, 2008 da Mata Atlântica no nordeste do Brasil, registrada no Jardim Botânico Benjamim Maranhão na Paraíba (Santos et al. 2008), além de três espécies da Caatinga, *R. potiguar* Santos, Ferreira & Buzzato, 2013, das cavernas da região oeste do RN, *R. ubajara* Santos, Ferreira & Buzzato, 2013 conhecida de uma caverna no Parque Nacional de Ubajara, e *R. pedrosoi* Giupponi, Miranda & Villareal, 2016, de uma caverna no município de Santa Quitéria, ambas do Ceará (Santos et al. 2013, Giupponi et al. 2016).

*Rowlandius potiguar* Santos, Ferreira & Buzzato, 2013 foi inicialmente registrada em 20 cavernas da região da Formação Jandaíra, incluindo no Parque Nacional da Furna Feia ao norte, e na caverna Casa de Pedra no município de Martins seu registro mais ao sul (Santos et al. 2013). Em seguida, a distribuição de

*R. potiguar* foi atualizada, com ocorrência em mais dez cavernas, totalizando 30 localidades (Bento et al. 2021).

A ampla distribuição de *R. potiguar*, em uma região atualmente semiárida marcada por mudanças paleoclimáticas (Santos et al. 2007) faz desta espécie um bom modelo para testar padrões evolutivos e de diversificação em ambientes subterrâneos terrestres na Caatinga. Estudos moleculares recentes com outros invertebrados que ocorrem na mesma região, indicaram que a cigarrinha troglóbia *Kinnapotiguara troglobia* (Hoch & Ferreira 2013, Bento 2021, Bento et al. 2024) e o grilo *Endecous potiguar* Castro-Souza, 2017, são complexos de espécies. No caso de *K. troglobia*, identificou-se estruturação populacional extrema e o possível papel do rio Apodi-Mossoró como barreira geográfica, assim como o isolamento de linhagens em cavernas de diferentes afloramentos calcários (lajedos). Quanto a *E. potiguar*, foram identificados quatro agrupamentos populacionais que também reforçam o possível papel do rio Apodi-Mossoró como barreira geográfica (Costa 2022).

Com base nos resultados encontrados para invertebrados cavernícolas coexistentes, como *K. troglobia* e *E. potiguar*, é possível que *R. potiguar* apresente um padrão similar, com linhagens crípticas e alta estruturação genética ao longo da sua distribuição. Então, por meio de estudo filogeográfico, objetivamos compreender a evolução e distribuição das linhagens ao longo do tempo, bem como analisar as relações genéticas entre populações e entender como fatores geográficos influenciaram seu desenvolvimento (Cunha & Solé 2012). Por fim, pretendemos descrever eventuais espécies novas usando tanto os dados moleculares quanto morfológicos, atualizar a distribuição geográfica das espécies e fornecer comentários sobre a conservação das mesmas.

### 3.6.3. Objetivos

#### *Objetivo geral*

Avaliar, por meio de uma abordagem filogenética e filogeográfica, a distribuição de *Rowlandius potiguar* nas cavernas da formação Jandaíra,

explicando os padrões e processos evolutivos envolvidos, e descrever eventuais espécies novas.

#### *Objetivos específicos*

- Delimitar linhagens de *R. potiguar* utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear;
- Estimar o tempo de divergência entre as linhagens e o padrão de estruturação gênico de cada espécie, para compreender os processos evolutivos;
- Fornecer informações ecológico-evolutivas de *R. potiguar*, ou seja, se é uma espécie troglóbia, composta por algumas espécies; ou troglófila com uma espécie com ampla distribuição geográfica;
- Se identificadas possíveis novas espécies, fornecer informações taxonômicas para sua descrição.

#### 3.6.4. Hipóteses e predições

##### *Hipótese geral*

A hipótese geral é a de que há linhagens distintas de *R. potiguar* ao longo da sua distribuição geográfica, com possível origem a partir de mudanças climáticas pretéritas na atual região da Caatinga durante os períodos entre o Mioceno e Plioceno sendo, portanto, um complexo de espécies.

##### *Predições*

- As divergências mais profundas correspondem aos eventos estimados entre o Mioceno e o Plioceno;
- Espera-se observar grupos monofiléticos em cada caverna e/ou afloramentos calcários (lajedos);
- Há linhagens de *R. potiguar* com altos índices de fixação entre as diferentes cavernas e indicação de contração populacional com o progressivo aumento da temperatura e isolamento nas cavernas da Caatinga após o último máximo glacial.

### 3.6.5. Destaques e resultados

- Os espécimes foram coletados em cavernas inseridas nos calcários da Formação Jandaíra, no RN, nos municípios de Mossoró, Baraúna, Felipe Guerra, Governador Dix-Sept Rosado e Apodi. Também foram realizadas coletas na caverna Casa de Pedra, que está inserida nos mármores da Formação Jucurutu, em Martins/RN (Figura 37). O dataset foi composto por indivíduos de 26 localidades, incluindo 14 registros inéditos para o táxon.

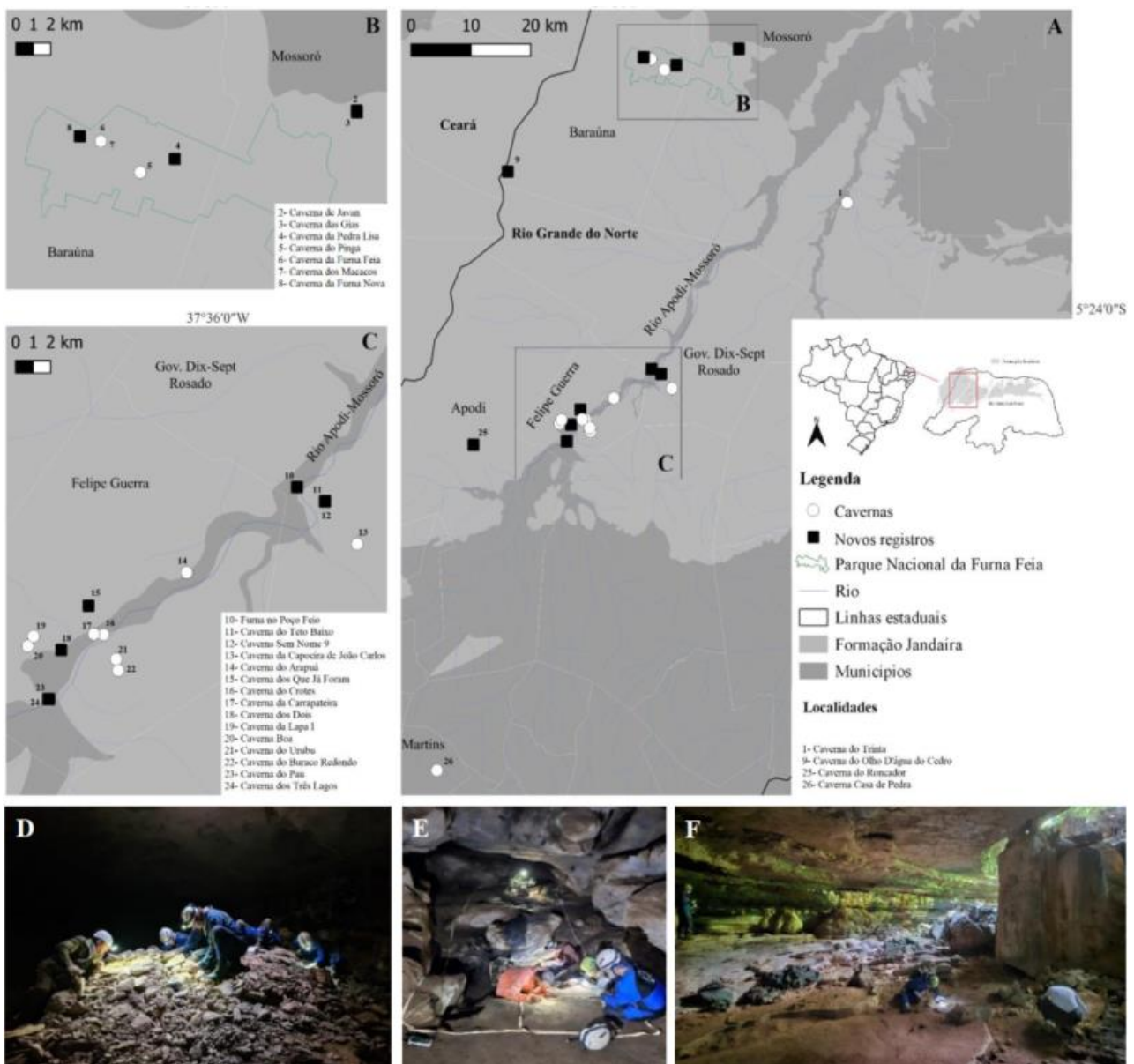


Figura 37. Mapa das cavernas com ocorrências já conhecidas (círculos brancos) e novos registros (quadrados pretos) de *Rowlandius* nas cavernas no RN. B – Pontos amostrados no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF). C – Ampliação da área com concentração de cavernas amostradas nos municípios de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado. D – Coleta na caverna da Furna Feia, localizada no PNFF, em Baraúna. E – Coleta na caverna Casa de Pedra, em Martins. F – Coleta na Caverna do Urubu, em Felipe Guerra.

- As análises moleculares foram baseadas em sequências parciais dos marcadores moleculares mitocondrial citocromo C oxidase I e nuclear rDNA 28S. Essas análises envolveram redes de haplótipos, estruturação populacional, demografia e diversidade genética, inferências filogenéticas bayesianas (IB) e diversos métodos de delimitação de linhagens.

- Para as análises morfológicas, foram separadas 22 fêmeas de 18 localidades coletadas a fim de avaliar a estrutura da genitália interna. Além disso, foram separados cinco machos de cinco localidades para exame da morfologia com o uso de um microscópio eletrônico de varredura, onde foram realizadas fotomicrografias do flagelo de machos de distintas cavernas. Adicionalmente, foi feita uma avaliação de dimorfismo sexual na espécie por meio de medidas corporais de 76 indivíduos, incluindo 34 fêmeas e 42 machos.

- Os dados moleculares e morfológicos analisados apontaram resultados similares, e serão detalhados mais à frente. Há a indicação da presença de ao menos uma possível espécie nova, a qual será referida como *Rowlandius* sp.n.1. Embora não tenha sido analisada a morfologia da linhagem que ocorre na caverna Casa de Pedra (CPD) em Martins/RN, os dados moleculares apontam uma separação a nível de espécie, e os indivíduos desta localidade serão referidos como *Rowlandius* sp.n.2. (Figura 38).

- Foram obtidas sequências parciais do gene mitocondrial *cox1* com 532 bp de 89 indivíduos de 24 localidades, com identificação de 40 haplótipos e do gene nuclear 28S com 1.027 bp de 44 indivíduos de 24 localidades, com sete haplótipos (Figura 39).

- A árvore filogenética com inferência bayesiana (IB) identificou três grandes clados com alto valor de suporte entre os ramos. Há uma concordância entre as árvores do gene *cox1* (Figura 40) e 28S (Figura 41), assim como a árvore utilizando dados multilocus (Figura 42). O clado da localidade tipo Gruta da Carrapateira (CAR) de *R. potiguar* (doravante chamado apenas de *R. potiguar*) é formado ainda por outras 14 localidades, incluindo sete das 12 novas localidades amostradas. Este clado foi recuperado como grupo-irmão do clado formado pelos indivíduos de *Rowlandius* sp.n.2, da caverna Casa de Pedra (CPD) em

Martins. O clado formado por *R. potiguar* e *Rowlandius* sp.n.2 foi recuperado como grupo-irmão de *Rowlandius* sp.n.1 formado por indivíduos coletados em nove cavernas. De acordo com as estimativas da IB com relógio molecular, a divergência mais profunda entre as linhagens ocorreu há 2.5 Ma [1.5-3.0 HPD], no final do Plioceno e começo do Pleistoceno. As linhagens *R. potiguar* e *Rowlandius* sp.n.2 teriam divergido há aproximadamente 1.7 Ma [1.2-2.5 HPD] e *R. ubajara* e *Rowlandius* sp.n.1 teriam divergido há cerca de 1.8 Ma [1.2- 2.8 HPD].

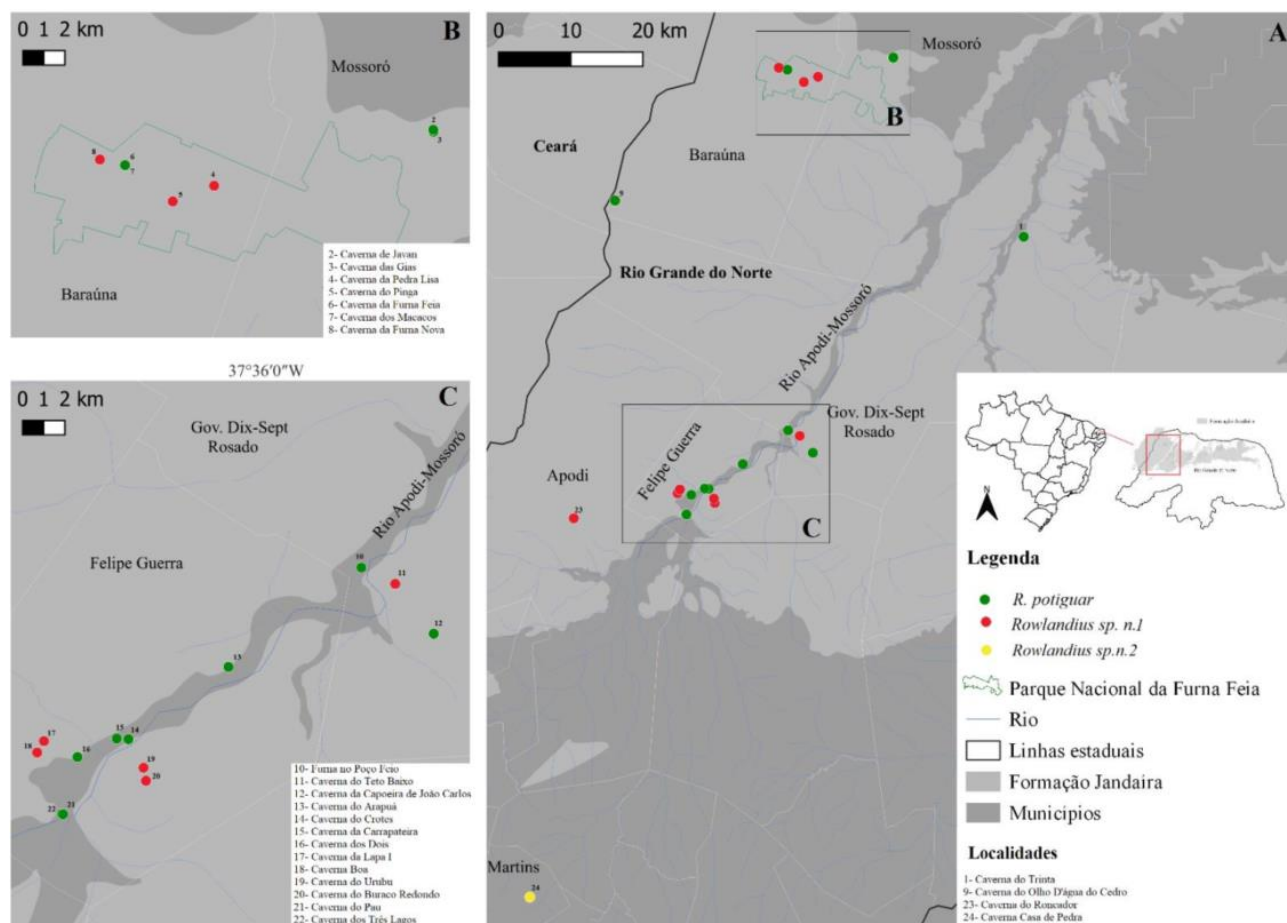


Figura 38. Distribuição das localidades avaliadas neste estudo das linhagens de *R. potiguar* (em verde), *Rowlandius* sp. n.1 (em vermelho) e *Rowlandius* sp.n.2 (em amarelo) de acordo com os resultados das análises moleculares. B - Recorte da área do Parque Nacional da Fuma Feia. C – Ampliação da área com concentração de cavernas amostradas nos municípios de Felipe Guerra e Gov. Dix-Sept Rosado.

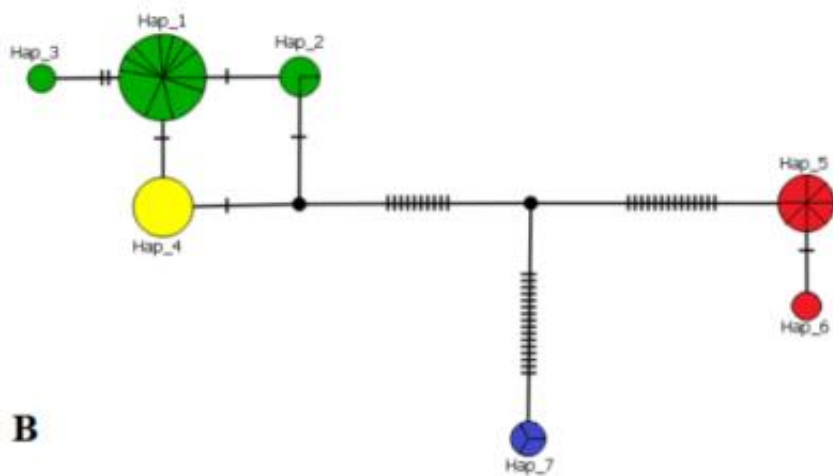
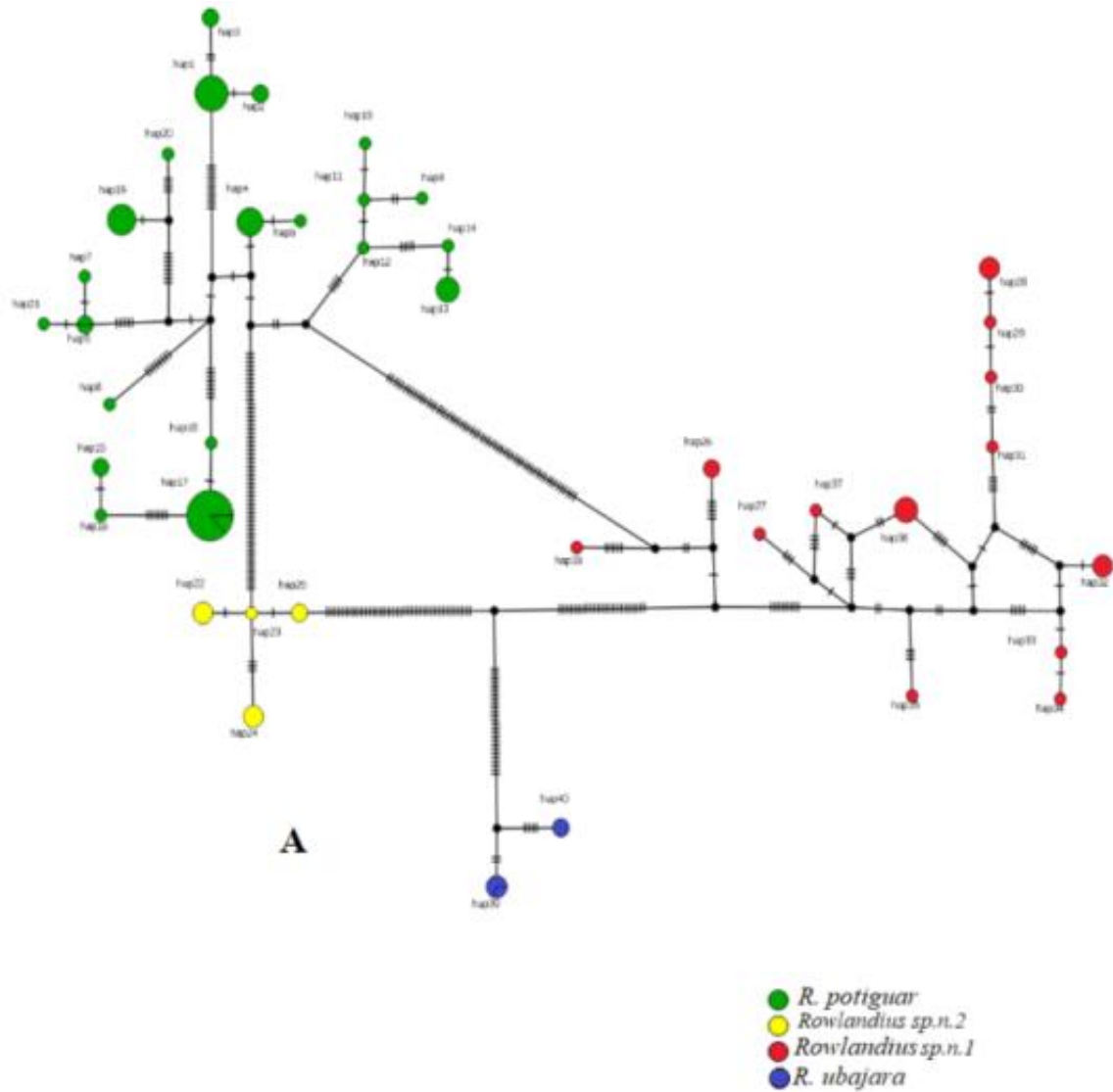


Figura 39. A – Rede de haplótipos de *Rowlandius* feita a partir do gene *cox1*. B – Rede de haplótipos feita a partir do gene 28S.

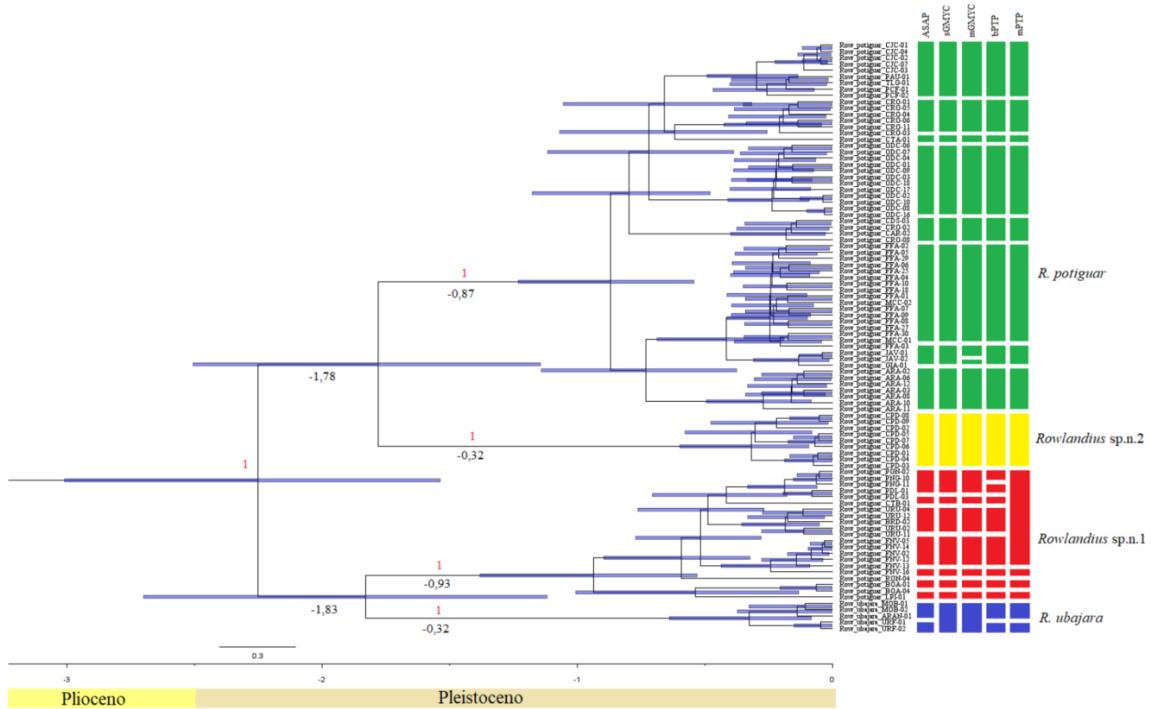


Figura 40. Árvore filogenética de consenso resultante de inferência bayesiana com relógio molecular e testes de delimitação de linhagens utilizando o gene *cox1*. Cada barra representa um método de delimitação de linhagem. As cores representam cada clado, sendo verde para *R. potiguar*, amarelo para *Rowlandius* sp.n.2, vermelho para *Rowlandius* sp.n.1 e azul para *R. ubajara* (grupo externo). Em cada ramo da árvore é apresentada a probabilidade posterior (acima) e a idade média estimada (abaixo). As barras roxas representam os intervalos com 95% HPD para a idade estimada.

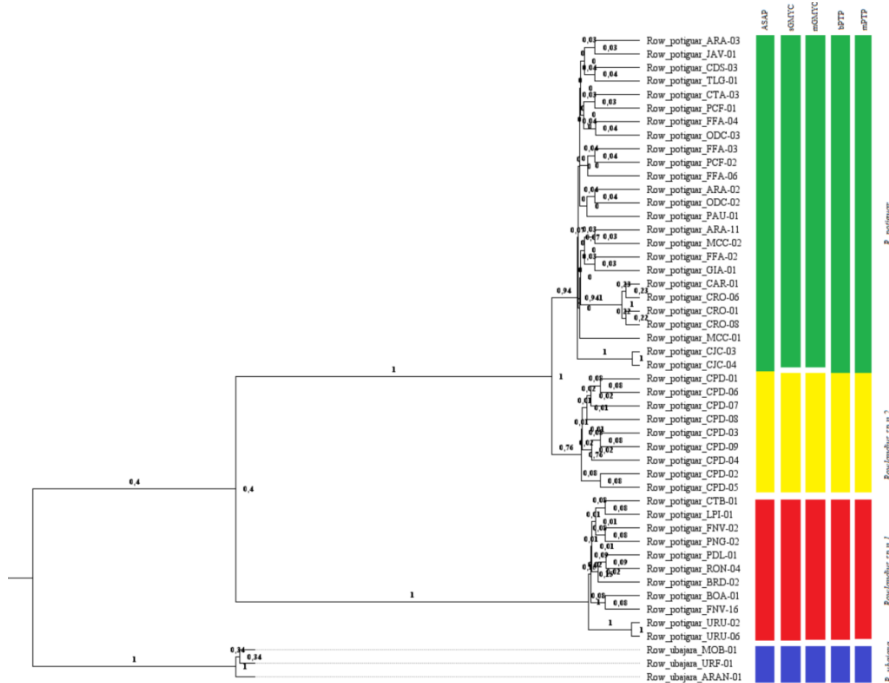


Figura 41. Árvore filogenética de consenso resultante de inferência bayesiana e testes de delimitação de linhagens utilizando o gene 28S. Cada barra representa um método de delimitação de linhagem. As cores representam cada clado, sendo verde para *R. potiguar*, amarelo para *Rowlandius* sp.n.2, vermelho para *Rowlandius* sp.n.1 e azul para *R. ubajara*. Cada ramo da árvore apresenta valor de probabilidade posterior.

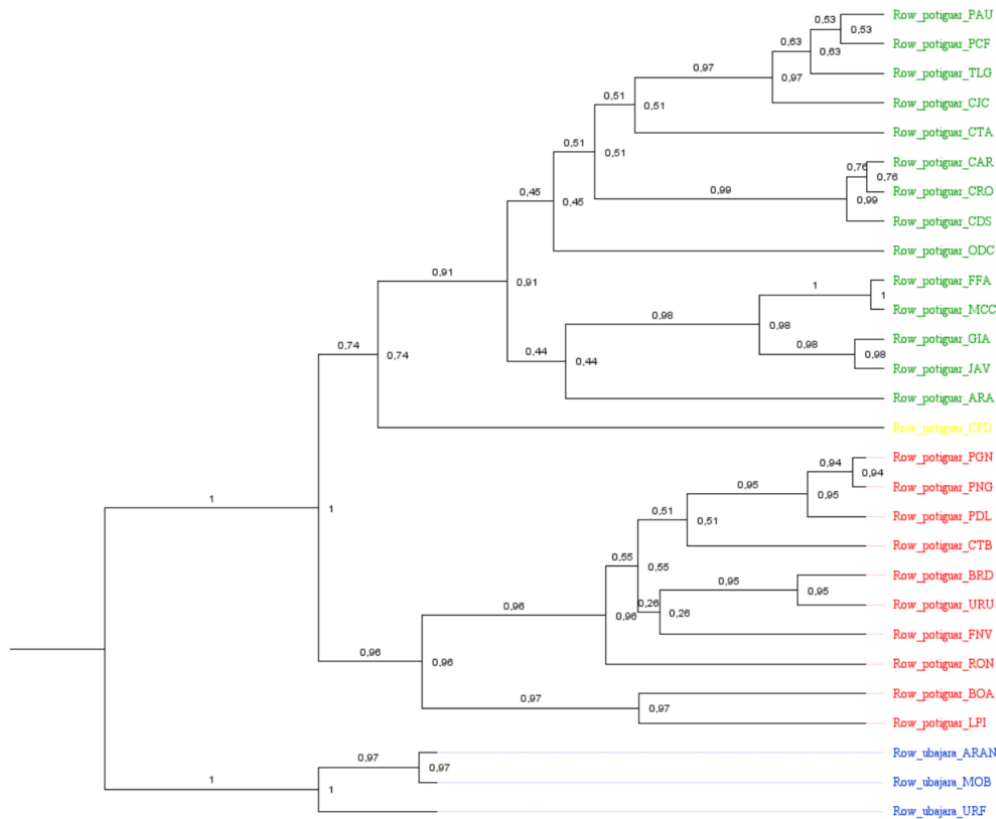


Figura 42. Árvore filogenética de consenso resultante de inferência bayesiana utilizando dados multilocus (*cox1* e *28S*). As cores representam cada clado, sendo verde para *R. potiguar*, amarelo para *Rowlandius* sp.n.2, vermelho para *Rowlandius* sp.n.1 e azul para *R. ubajara*. Cada ramo da árvore apresenta valor de probabilidade posterior.

- A distância genética entre as espécies nominais (*R. potiguar* e *R. ubajara*) corresponde a 15.6% (Tabela 2), valores semelhantes aos observados entre *R. potiguar* e *R. sp.n.1* (16.7%) e entre *R. potiguar* e *R. sp.n.2* (13.8%). As distâncias interespecíficas foram muito maiores que as intraespecíficas, que não ultrapassaram 3% em *R. potiguar* e 1% em *Rowlandius* sp.n.1. Maiores detalhes sobre as demais análises moleculares, incluindo estruturação populacional, demografia, diversidade genética e estimativas de fluxo gênico podem ser consultados no documento original anexo a este relatório.

- Em relação às análises morfológicas, foram identificadas diferenças importantes em caracteres considerados diagnósticos, como a genitália interna das fêmeas, e na morfologia do flagelo e do processo póstero-dorsal abdominal dos machos. Assim, em função das análises sustentadas pelos resultados moleculares e morfológicos, é proposta a atualização da taxonomia e distribuição geográfica de *R. potiguar* e a descrição de duas novas espécies para o gênero.

### 3.6.6 Considerações finais

Os resultados do trabalho permitiram a ampliação da distribuição geográfica de *R. potiguar* e a identificação de duas novas espécies para o gênero. Após a delimitação das espécies, *R. potiguar* ocorre em 33 cavernas, *R. sp.n.1* em 13, ambas na Formação Jandaíra, e *R. sp.n.2* apenas na caverna Casa de Pedra, na Formação Jucurutu, no município de Martins/RN. *R. ubajara* também foi registrada em mais três cavernas (quatro no total), sugerindo que a outra espécie da Caatinga, *R. pedrosoi* também possa ocorrer em outras cavernas adjacentes. Além das análises dos dados moleculares e morfológicos apontarem consistentemente para a existência de um complexo de espécies, com duas potenciais espécies novas, os dados moleculares indicaram populações bem estruturadas de *R. potiguar* e *R. sp.n.1* nas cavernas da Formação Jandaíra, desafiando a concepção anterior de uma única espécie com ampla distribuição.

Apesar de algumas cavernas onde *R. potiguar* e *R. sp.n.1* ocorrem estarem protegidas no Parque Nacional da Furna Feia, a maioria das localidades encontram-se fora de áreas protegidas, continuando vulneráveis às diferentes ameaças como visitação desordenada, mineração, desmatamento e atividades agropecuárias (Ferreira et al. 2010). Ressaltamos a importância de considerar estratégias de conservação das cavernas que não estão em áreas protegidas e que incluem populações distintas, sobretudo as que apresentam haplótipos exclusivos e com maior diversidade nucleotídica, como é o caso das em Felipe Guerra e Gov. Dix-Sept Rosado. Quanto à espécie *R. sp. 2*, apesar de estar restrita a uma única localidade, a caverna Casa de Pedra encontra-se dentro de uma UC estadual, o Monumento Natural Cavernas de Martins. Esta UC, no entanto, foi criada recentemente e ainda não está devidamente implantada. Durante as coletas, por exemplo, foram verificados diversos impactos associados ao turismo desordenado (tais como pisações, lixo e compactação do piso da caverna).

A atualização da taxonomia e distribuição geográfica de *R. potiguar*, bem como a ampliação da riqueza do gênero *Rowlandius* nas cavernas da Caatinga, não apenas aprimora nosso entendimento sobre a biodiversidade dessa região, mas também proporciona informações para a conservação dessas espécies.

### **3.7. Living in the subterranean time: Exploring biological rhythms in cave invertebrates**

Este subprojeto resultou na Dissertação de Mestrado da pesquisadora Priscila Emanuela de Souza. Ela foi defendida e aprovada em março de 2024, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A tese está disponível nos anexos a este relatório, e pode ser consultada também no repositório da UFLA, após o período de embargo, no link <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/59188>.




Além da dissertação e artigos, que serão abordados mais à frente, o subprojeto gerou ainda um produto inovador. Trata-se de um software em código aberto para processamento de vídeo em tempo real com detecção de movimento, necessário para as análises cronobiológicas. O software, denominado “Arthropod Motion”, foi desenvolvido pela startup Voxar Labs (<https://voxarlabs.cin.ufpe.br/>), vinculada à Universidade Federal de Pernambuco, e também se encontra nos anexos a este relatório.

Retornando à dissertação propriamente dita, ela foi dividida em uma introdução geral e três capítulos. O primeiro capítulo é uma revisão sobre os ritmos biológicos em invertebrados cavernícolas, e foi recentemente publicado como artigo na prestigiada revista Chronobiology International (Figura 43) e está disponível no link <https://doi.org/10.1080/07420528.2024.2348010> e nos anexos a este relatório. O segundo capítulo trata de diferenças nos padrões de atividade locomotora em isópodes troglóbios de cavernas na Bahia e Minas Gerais, também foi recentemente publicado como artigo na revista Chronobiology International (Figura 43), está disponível no link <https://doi.org/10.1080/07420528.2024.2391865> e nos anexos a este relatório. O terceiro capítulo trata da variabilidade de ritmos biológicos em ambliopígeos troglóbios e troglófilos de várias regiões do Brasil. Como apenas o terceiro capítulo envolve espécies das áreas alvo do projeto, trataremos de maneira mais detalhada apenas dele neste relatório.

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados da dissertação.



## The ticking clock in the dark: Review of biological rhythms in cave invertebrates

Priscila Emanuela de Souza , Marconi Souza-Silva , and Rodrigo Lopes Ferreira 

Department of Ecology and Conservation, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil

### ABSTRACT

Circadian clocks, internal mechanisms that generate 24-hour rhythms, play a crucial role in coordinating biological events with day-night cycles. In light-deprived environments such as caves, species, particularly isolated obligatory trogllobites, may exhibit evolutionary adaptations in biological rhythms due to light exposure. To explore rhythm expression in these settings, we conducted a comprehensive literature review on invertebrate chronobiology in global subterranean ecosystems, analyzing 44 selected studies out of over 480 identified as of September 2023. These studies revealed significant taxonomic diversity, primarily among terrestrial species like Coleoptera, with research concentrated in the United States, Italy, France, Australia, and Brazil, and a notable gap in African records. Trogllobite species displayed a higher incidence of aperiodic behavior, while troglophiles showed a robust association with rhythm expression. Locomotor activity was the most studied aspect (>60%). However, approximately 4% of studies lacked information on periodicity or rhythm asynchrony, and limited research under constant light conditions hindered definitive conclusions. This review underscores the need to expand chronobiological research globally, encompassing diverse geographical regions and taxa, to deepen our understanding of biological rhythms in subterranean species. Such insights are crucial for preserving the resilience of subsurface ecosystems facing threats like climate change and habitat loss.

### ARTICLE HISTORY

Received 7 January 2024  
Revised 2 April 2024  
Accepted 19 April 2024




### KEYWORDS

Cave; biological clock; rhythms; invertebrates; cave-dwelling; arrhythmia



### ORIGINAL ARTICLE

## Divergent patterns of locomotor activity in cave isopods (Oniscidea: Styloniscidae) in Neotropics

Priscila Emanuela de Souza <sup>a,b</sup>, Bruno da Silva Brandão Gonçalves <sup>c</sup>, Marconi Souza-Silva <sup>a,b</sup>, and Rodrigo Lopes Ferreira <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Center of Studies on Subterranean Biology, Department of Ecology and Conservation, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil; <sup>b</sup>Graduate Program in Applied Ecology, Department of Ecology and Conservation, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil; <sup>c</sup>Copacabana Tecnologia da Informação LTDA, Sumaré, Brazil

### ABSTRACT

In cave environments, stable conditions devoid of light-dark cycles and temperature fluctuations sustain circadian clock mechanisms across various species. However, species adapted to these conditions may exhibit disruption of circadian rhythm in locomotor activity. This study examines potential rhythm loss due to convergent evolution in five semi-aquatic trogllobitic isopod species (Crustacea: Styloniscidae), focusing on its impact on locomotor activity. The hypothesis posits that these species display aperiodic locomotor activity patterns. Isopods were subjected to three treatments: constant red light (DD), constant light (LL), and light-dark cycles (LD 12:12), totaling 1656 h. Circadian rhythm analysis employed the Sokolove and Bushell periodogram chi-square test, Hurst coefficient calculation, intermediate stability (IS), and activity differences for each species. Predominantly, all species exhibited an infradian rhythm under DD and LL. There was synchronization of the locomotor rhythm in LD, likely as a result of masking. Three species displayed diurnal activity, while two exhibited nocturnal activity. The Hurst coefficient indicated rhythmic persistence, with LD showing higher variability. LD conditions demonstrated higher IS values, suggesting synchronized rhythms across species. Significant individual variations were observed within species across the three conditions. Contrary to the hypothesis, all species exhibited synchronization under light-dark conditions. Analyzing circadian activity provides insights into organism adaptation to non-cyclical environments, emphasizing the importance of exploring underlying mechanisms.

### ARTICLE HISTORY

Received 18 March 2024  
Revised 23 July 2024  
Accepted 7 August 2024

### KEYWORDS

Cave; biological clock; circadian rhythm; invertebrates; locomotor activity

Figura 43. Artigos resultantes do primeiro e segundo capítulos da dissertação da pesquisadora Priscila Emanuela de Souza.

### 3.7.1. Resumo geral

Os manuscritos apresentados nesta dissertação emergiram da necessidade de ampliar o conhecimento das lacunas existentes na área da cronobiologia em cavernas, especialmente com invertebrados, os quais exibem uma diversidade de morfologias, fisiologias e comportamentos associados aos diferentes níveis de adaptação a esses ambientes cíclicos. Nesse contexto, esses ecossistemas são caracterizados pela baixa variabilidade abiótica e pela ausência de ciclos claro-escuro. Dessa forma, os organismos manifestam seus ritmos biológicos de maneiras diversas individualmente e entre os diferentes táxons, sem apresentar um padrão claro entre as categorias ecológico-evolutivas que compõem a fauna cavernícola. Essa percepção serviu como base para as hipóteses investigadas no segundo e terceiro manuscritos. O objetivo geral desta dissertação foi não apenas entender a manifestação dos ritmos biológicos na fauna de invertebrados cavernícolas, mas também entender como esses ritmos podem variar entre diferentes classes taxonômicas. A literatura destaca a adaptação do relógio biológico em cavidades naturais subterrâneas, onde fatores como luz, temperatura e alimentação desempenham papel significativo na regulação dos ritmos biológicos. Estudos demonstram a evolução de relógios não circadianos devido à ausência de ciclos diurnos, resultando em ciclos infradianos ou ultradianos. Apesar dos avanços realizados, há ainda lacunas a serem exploradas na pesquisa sobre a ritmicidade de invertebrados em ambientes subterrâneos. O primeiro manuscrito, um artigo de revisão, se concentrou em quatro questões principais: (i) as regiões geográficas mais estudadas em relação à cronobiologia de invertebrados de cavernas, (ii) os táxons mais frequentemente estudados, (iii) as características evolutivas dos táxons documentados e (iv) a manifestação do comportamento rítmico dos invertebrados em ambientes sem ciclos e sua correlação com a morfologia funcional. O segundo manuscrito surgiu de uma lacuna na pesquisa sobre o comportamento rítmico de isópodes em ecossistemas subterrâneos, enfatizando a importância de investigar esse grupo pouco explorado em relação aos padrões de atividade locomotora. Nesse contexto, a pesquisa concentrou-se na possibilidade de perda de elementos

rítmicos devido à evolução convergente em ambientes subterrâneos. Foi formulada a hipótese de que diferentes espécies de isópodes semiaquáticos obrigatórios apresentam padrões aperiódicos em sua atividade locomotora, devido à falta de ciclos de luz nas cavernas e à variabilidade térmica, fatores cruciais para a regulação dos ritmos biológicos. Os resultados indicaram sincronização do ritmo circadiano dentro do tratamento LD, embora sem padrões claramente definidos sob condições constantes de luz e escuridão. O terceiro manuscrito surgiu da lacuna nos estudos cronobiológicos envolvendo amblipígios e investigou possíveis diferenças nos padrões rítmicos entre espécies troglófilas (capazes de estabelecer populações tanto dentro quanto fora de cavernas) e troglóbias (obrigatoriamente confinadas a cavernas). Foi encontrada variabilidade no comportamento rítmico, porém não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ou entre as espécies; as distinções foram identificadas a nível individual. Essas constatações ressaltam a importância de preencher lacunas na pesquisa sobre a ritmicidade em cavernas, expandindo às áreas geográficas e diversificando os grupos taxonômicos estudados. É essencial investigar os processos temporais, evolutivos e ecológicos dos ritmos biológicos para compreender as adaptações da vida no subterrâneo, especialmente diante de ameaças como mudanças climáticas e perda de habitat. Isso não apenas pode contribuir para a preservação dos ecossistemas subterrâneos, fornecendo informações cruciais para sua conservação e manejo, mas também impulsionar avanços na ecologia e no entendimento evolutivo desses ambientes.

### 3.7.2. Introdução geral

As cavernas constituem ecossistemas que oferecem uma diversidade de microambientes, desde zonas de entrada com escuridão parcial até locais de escuridão total (afótica), caracterizados por variações ambientais praticamente ausentes ao longo do dia e mínimas ao longo do ano (Poulson & White 1969). Em comparação com os ambientes de superfície, as cavernas proporcionam condições mais estáveis (Culver & Pipan, 2009) e, portanto, são consideradas arrítmicas (Beale et al. 2016). Esses ambientes abrigam uma fauna característica,

adaptada à vida subterrânea, apresentando morfologias, fisiologias, modos de reprodução, ritmos de atividade e comportamentos distintos daqueles observados em animais que habitam a superfície, sujeitos a ciclos diários de claro e escuro (Soriano-Morales et al. 2013).

Os ambientes subterrâneos são geralmente considerados os menos propensos a apresentar ritmos cíclicos entre os habitats com essa característica (Abhilash et al. 2017). Contudo, a persistência de ritmos em organismos que habitam cavernas nos leva a questionar sua finalidade e relevância, mesmo na ausência de uma coordenação direta da fisiologia do animal com o ambiente externo (Beale et al. 2016). Os ritmos circadianos em ambientes desprovidos de ritmo são vestigiais, com diferentes espécies mantendo diferentes níveis de funcionalidade (Pasquali & Sbordoni 2014, Beale et al. 2016).

Os relógios circadianos desempenham um papel crucial na coordenação temporal de processos internos e na separação temporal de atividades incompatíveis, de acordo com a hipótese da vantagem intrínseca (Nikhil & Sharma 2017). Essa ideia é sustentada pela observação de múltiplos ritmos diários em escalas biológicas e na coordenação temporal.

Em geral, o comportamento rítmico dos invertebrados reflete sua habilidade de adaptação e sincronização de atividades com pistas ambientais, destacando a complexa relação entre os relógios biológicos internos e os fatores ambientais externos (Brady 1981).

Considerando a relevância desses ambientes e as lacunas de conhecimento que os cercam, estudos sobre ritmicidade em animais de cavernas podem desempenhar um papel fundamental na compreensão dos mecanismos intrínsecos (processos biológicos internos que regulam os ritmos biológicos (diários e circadianos, por exemplo) e extrínsecos (fatores externos que influenciam os ritmos circadianos, conhecidos como zeitgeber), assim como no valor adaptativo dessas características. Em cavernas, onde os fatores externos ou abióticos exercem pouca influência sobre os relógios biológicos dos animais que nelas habitam, devido à sua alta estabilidade, ainda permanece desconhecido

um padrão que permita compreender como esses processos ocorrem e se manifestam em diferentes grupos taxonômicos.

3.7.3. Capítulo III – We prefer nighttime, they prefer daytime: Biological rhythm variability in cave-dwelling amblypygids (Amblypygi: Charinidae) in the Neotropics

*Resumo traduzido*

A falta de entendimento sobre como fatores endógenos e comportamentais afetam os ritmos biológicos de aracnídeos amblipígios em ambientes de cavernas ressalta uma lacuna no conhecimento cronobiológico para este grupo. Este estudo investiga a influência da especialização em habitats subterrâneos e a presença de ritmos biológicos nos padrões de atividade locomotora das espécies troglóbias e troglófilas do gênero *Charinus*. Espécimes coletados em cavernas carbonáticas no Brasil foram submetidos a tratamentos experimentais de luz constante (LL), escuridão constante (DD) e ciclos claro-escuro (LD). Os resultados revelaram variações na distribuição dos principais períodos entre as espécies, sem um padrão uniforme. Embora alguns espécimes tenham mostrado maior variabilidade nos padrões de atividade nos tratamentos DD e LL, não foram observadas diferenças significativas entre troglóbios e troglófilos. A falta de uma distinção clara nos ritmos entre os dois grupos sugere uma natureza dinâmica dos ritmos circadianos nessas populações, com variações individuais nos padrões de atividade, indicando diversidade comportamental. Além disso, a competição intraespecífica por recursos alimentares, provavelmente intensificada pelas condições oligotróficas dos ambientes de cavernas, pode desempenhar um papel importante na formação desses padrões e diferenças nas fases de atividade. A presença de ritmos infradianos e ritmos circadianos fracos em alguns indivíduos ressalta a importância de considerar zeitgebers não fóticos para uma compreensão mais profunda desses ritmos em organismos cavernícolas.

### *Destaques e resultados*

- A ordem Amblypygi Thorell, 1883 compreende aracnídeos que habitam microhabitats específicos, incluindo fendas, acúmulos de detritos, bromélias, a parte inferior de rochas e troncos de árvores, bem como cavernas (Miranda et al., 2018). Muitas espécies demonstram fidelidade a esses locais para captura de presas, defesa territorial e reprodução. Reconhecidos como predadores, esses animais têm uma dieta variada e oportunista, e também podem apresentar comportamento de necrofagia (Prous et al. 2017, Trujillo et al. 2021).

- Chapin e Hebets (2016) observaram que os ambliplígijs são mais ativos no crepúsculo, envolvendo-se em exploração e forrageamento, enquanto se tornam mais imóveis durante o dia. Em cavernas, suas populações exibem comportamentos distintos em vigilância, preferência de habitat e predação em comparação com espécies epígeas. Atos de predação e vigilância são mais pronunciados em animais hipógeos (Chapin 2015), e a agressão no comportamento agonístico entre os machos é de menor intensidade. Acredita-se que essas diferenças resultem da plasticidade comportamental em resposta ao ambiente em que vivem (Miranda et al. 2016, Segovia et al. 2018).

- Até o momento, nenhum estudo ofereceu uma compreensão abrangente de como fatores endógenos e comportamentais influenciam os ritmos biológicos desses animais em ambientes de cavernas. Essa lacuna apresenta limitações significativas na compreensão de seus padrões de atividade, enfatizando a necessidade urgente de mais pesquisas para obter insights mais profundos sobre o funcionamento do relógio biológico em ecossistemas subterrâneos naturais.

- Espécies cavernícolas não obrigatórias mantêm seus sistemas visuais, incluindo órgãos sensoriais e partes do sistema nervoso central. Suas atividades diárias são reguladas por estímulos circadianos, e variações nessas atividades podem indicar a influência de fatores ambientais na sincronização de ritmos biológicos, ajustados por meio de convergências fenotípicas (Oda et al. 2000, Duboué & Borowsky 2012, Friedrich 2013). Por outro lado, os troglóbios são altamente especializados e frequentemente exibem uma ausência completa de visão e pigmentação, juntamente com apêndices alongados, metabolismo

especializado e sistemas sensoriais aprimorados (Trajano et al. 2009, Pasquali & Sbordoni 2014; Beale, Whitmore & Moran 2016). Essas características compartilhadas passaram por extensos processos evolutivos após a colonização de populações epígeas no ambiente cavernícola (Pasquali & Sbordoni, 2014).

- Assim, o estudo teve como objetivo investigar se o grau de especialização e a presença de elementos rítmicos influenciam os padrões de atividade locomotora de espécies de amblipígios troglóbios e troglófilos pertencentes ao gênero *Charinus*. Este gênero apresenta ampla distribuição, compreendendo atualmente 97 espécies (Miranda et al. 2021). Com base nisso, formulamos as seguintes hipóteses: i) espera-se que espécies troglóbias apresentem um ritmo circadiano fraco ou ausente, demonstrando assim assincronia em seus padrões de atividade; ii) espera-se que espécies troglófilas apresentem um ritmo circadiano mais pronunciado e tendam a sincronizar seus padrões de atividade com o ciclo claro-escuro.

- O estudo incluiu quatro espécies troglófilas e quatro espécies troglóbias do gênero *Charinus*. Os troglófilos foram representados pelas seguintes espécies: *Charinus santanensis*, *C. jibaossu*, *C. potiguar* e *C. iuiu* (Figura 44). Enquanto as espécies *C. eleonora*, *C. spelaeus*, *C. taboa* e *C. troglobius* são troglóbias. As espécies ocorrem no Rio Grande do Norte (*C. potiguar*), Bahia (*C. santanensis*, *C. troglobius* e *C. iuiu*) e Minas Gerais (*C. eleonora*, *C. spelaeus*, *C. taboa* e *C. jibaossu*) (Figura 45).

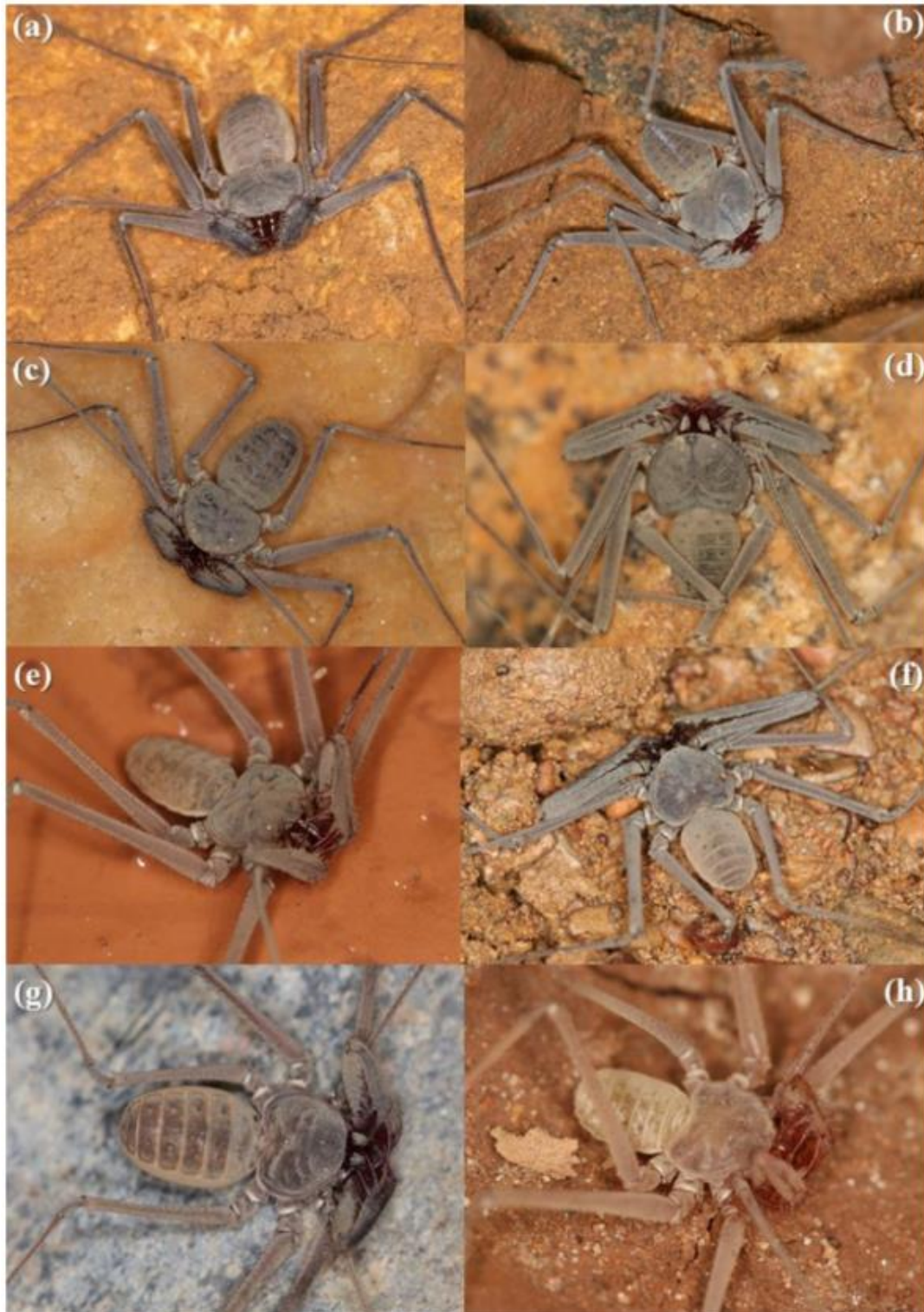


Figura 44. Espécies escolhidas e coletadas para o estudo: (A) *Charinus potiguar*, (B) *C. iuiu*, (D) *C. santanensis*, (D) *C. jibaossu*, (E) *C. eleonora*, (F) *C. taboa*, (G) *C. spelaeus*, (F) *C. troglobius*. Fotos de Rodrigo L. Ferreira (B - F) e Diego de M. Bento (A).

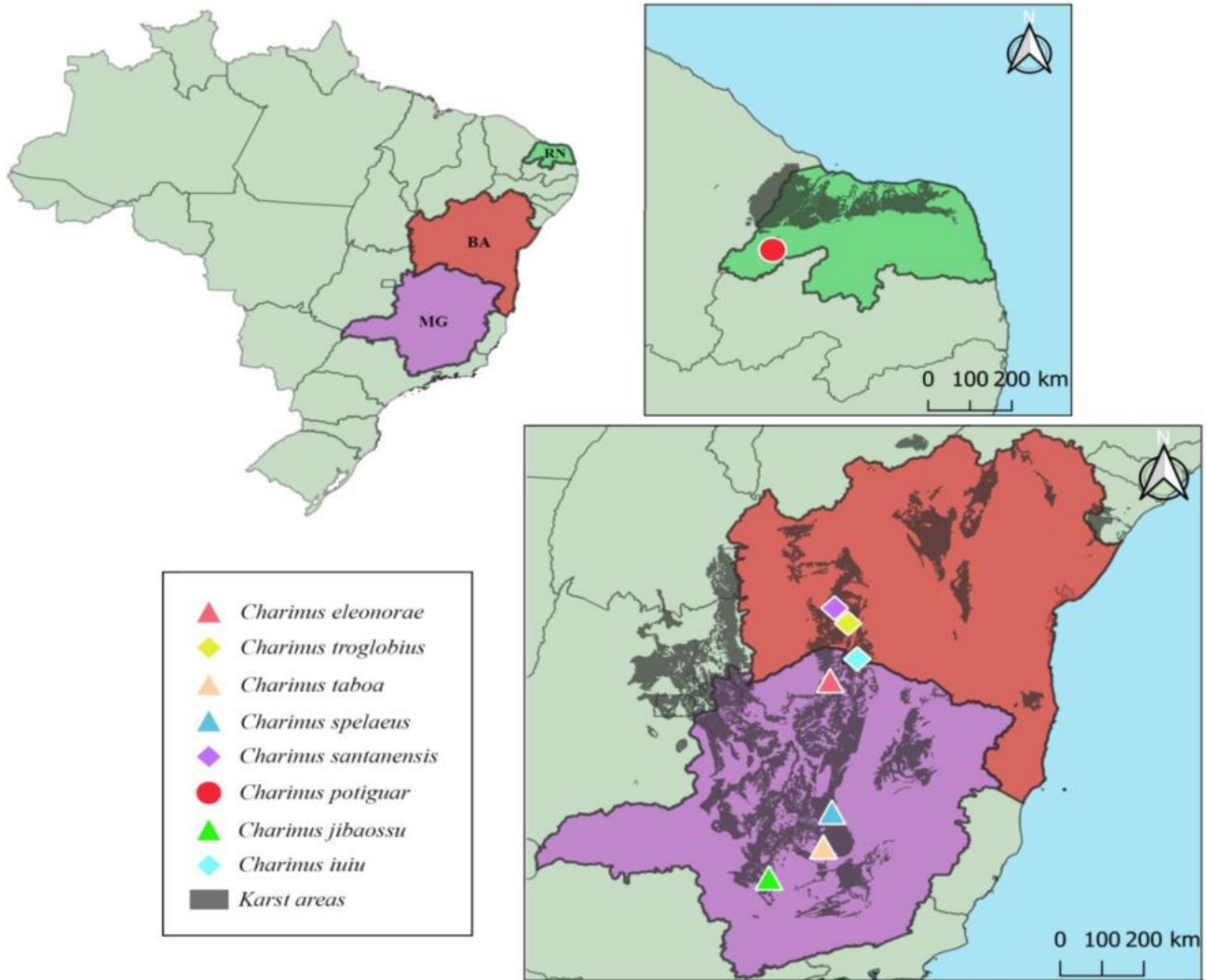


Figura 45. Localização das áreas de coleta das espécies escolhidas e coletadas para o estudo.

- O estudo envolveu, no máximo, 10 indivíduos por espécie por caverna. Esses indivíduos foram capturados e isolados em recipientes plásticos isolados termicamente e mantidos com umidade elevada. Em laboratório, os espécimes foram realocados para câmaras climaticamente controladas e mantidos em condições adequadas até o início dos experimentos.

- Para analisar os padrões de atividade e repouso de cada espécie, os espécimes foram alojados em estruturas plásticas cônicas revestidas com uma fina camada de areia umedecida para manter a umidade. Essas estruturas foram então cobertas com tampas de vidro do mesmo diâmetro (Figura 46). Os funis apresentavam pequenos furos para circulação de ar e evaporação de água, enquanto as tampas de vidro transparente foram projetadas para facilitar a captura eficiente de imagens. Para a gravação em vídeo dos movimentos dos

animais, foi utilizada uma webcam conectada a um computador e a gravação foi conduzida com o software de código aberto "Arthropod Motion" desenvolvido durante o projeto e especificamente adaptado para o estudo. Este sistema permitiu a captura simultânea de vídeo de duas espécies, garantindo o monitoramento individual da atividade locomotora.

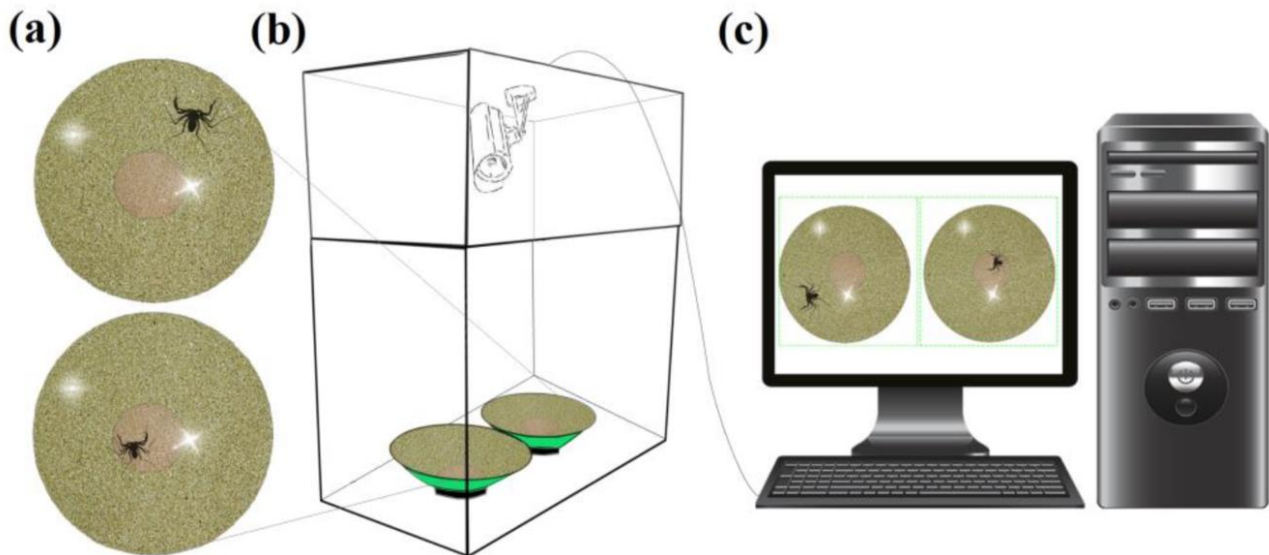


Figura 46. Estrutura de dados de amostragem. (A) Funis onde os espécimes foram alojados para registrar os ritmos locomotores, (B) um aquário onde os funis são mantidos para filmar os movimentos por meio de uma webcam acoplada a uma estrutura de isopor, (C) um computador que registra os movimentos pela webcam por meio de software.

- Antes da realização dos testes, os espécimes foram submetidos a um período de pré-exposição de três dias ao tratamento correspondente ao que seria posteriormente avaliado, escuridão total (DD), iluminação constante (LL) ou alternância entre períodos de luz e escuridão (LD), cada um com duração de 12 horas. As atividades locomotoras dos espécimes foram registradas durante um período de 12 meses.

- Em relação à periodicidade e variabilidade dos ritmos biológicos entre as espécies, a distribuição dos períodos primários entre os indivíduos de cada espécie não apresentou uma concentração uniforme (Figura 47). Ao longo dos três dias consecutivos de avaliação sob o tratamento LD, as médias das ondas, determinadas pelos picos máximos dos indivíduos, não apresentaram um padrão claro na maioria das espécies.

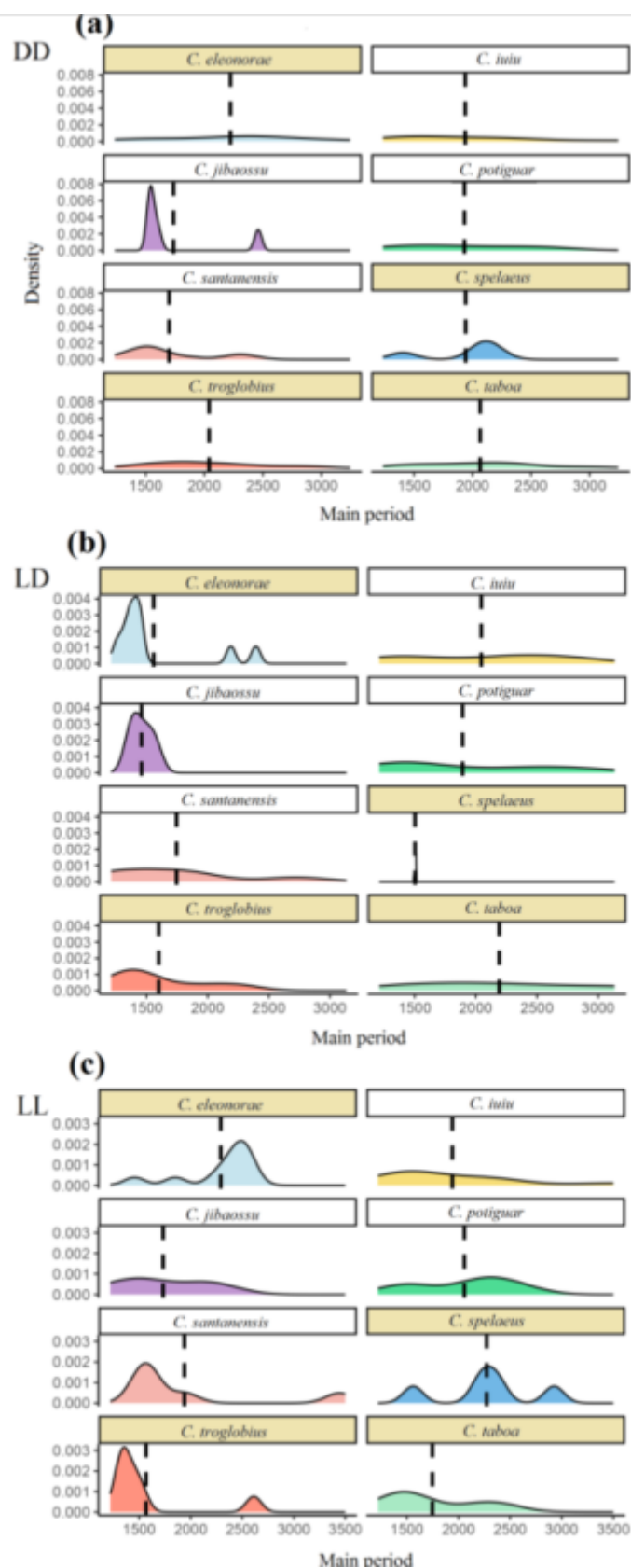


Figura 47. Distribuição dos principais períodos entre as espécies amostradas, com as espécies troglóbias *C. eleonorae*, *C. troglobius*, *C. taboa* e *C. spelaeus* identificadas em amarelo. A) Curvas de densidade na distribuição dos dados do periodograma para o tratamento DD, B) LD e C) LL. A linha vertical tracejada representa a média dos valores brutos.

- Em relação aos principais períodos de atividade em troglóbios e troglófilos, nenhuma diferença significativa foi detectada na distribuição dos valores do período principal (Figura 48). Não houve um padrão consistente na determinação do tipo de ritmo, e todas as espécies apresentaram indivíduos com períodos infradianos e circadianos nos tratamentos DD e LL. No entanto, no tratamento LD, apenas *C. jibaossu* e *C. spelaeus* aderiram estritamente a um ritmo circadiano.

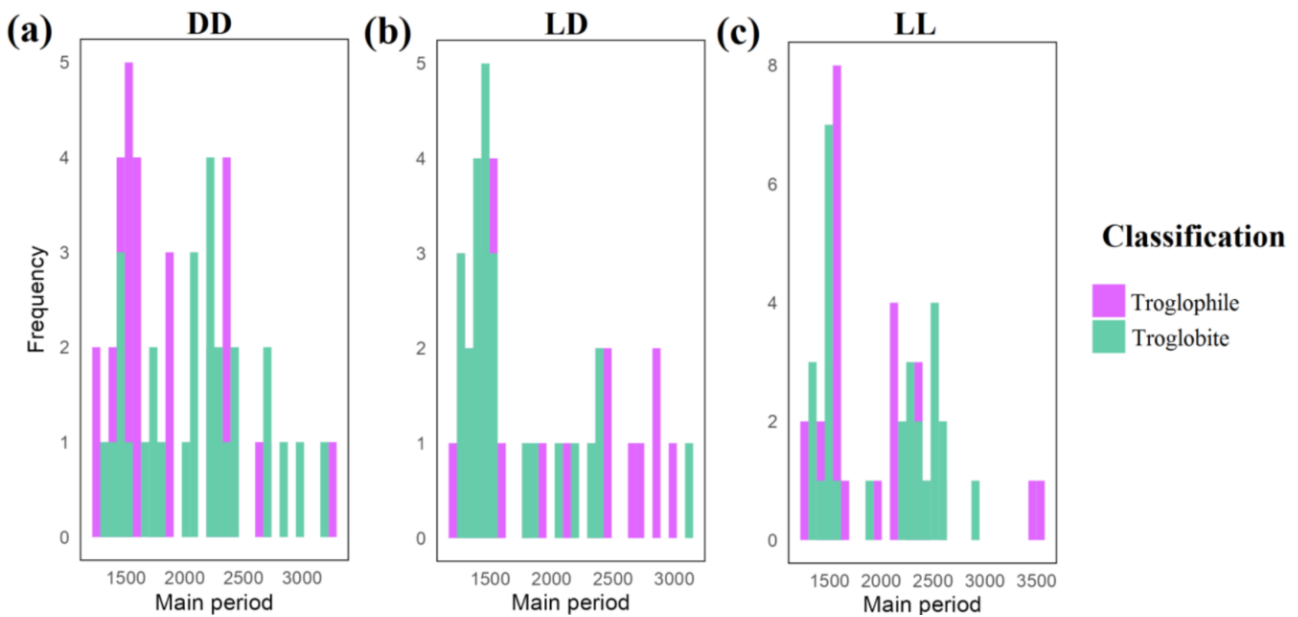




Figura 48. Distribuição de frequência dos valores de periodicidade determinados pelos principais períodos entre espécies troglófilas e troglóbias, para os tratamentos (A) DD, (B) LD e (C) LL.

- Em relação às diferenças na atividade individual, com base nos dados do tratamento LD, não foram observados padrões distintos ou variações significativas entre as duas categorias ecológico-evolutivas (troglóbios ou troglófilos) (Figura 49). No entanto, todos os indivíduos de *Charinus santanensis* exibiram atividade diurna, e mais de 80% dos indivíduos de *C. iuiu* e *C. eleonora* também eram diurnos. Apenas *C. jibaossu* e *C. troglobius* mostraram uma proporção maior de indivíduos com atividade noturna. As espécies restantes (*C. potiguar*, *C. spaeleus* e *C. taboa*) exibiram indivíduos com atividades diurnas e noturnas, sem uma preferência clara por um período de atividade específico.

Activity  Nocturnal  Diurnal

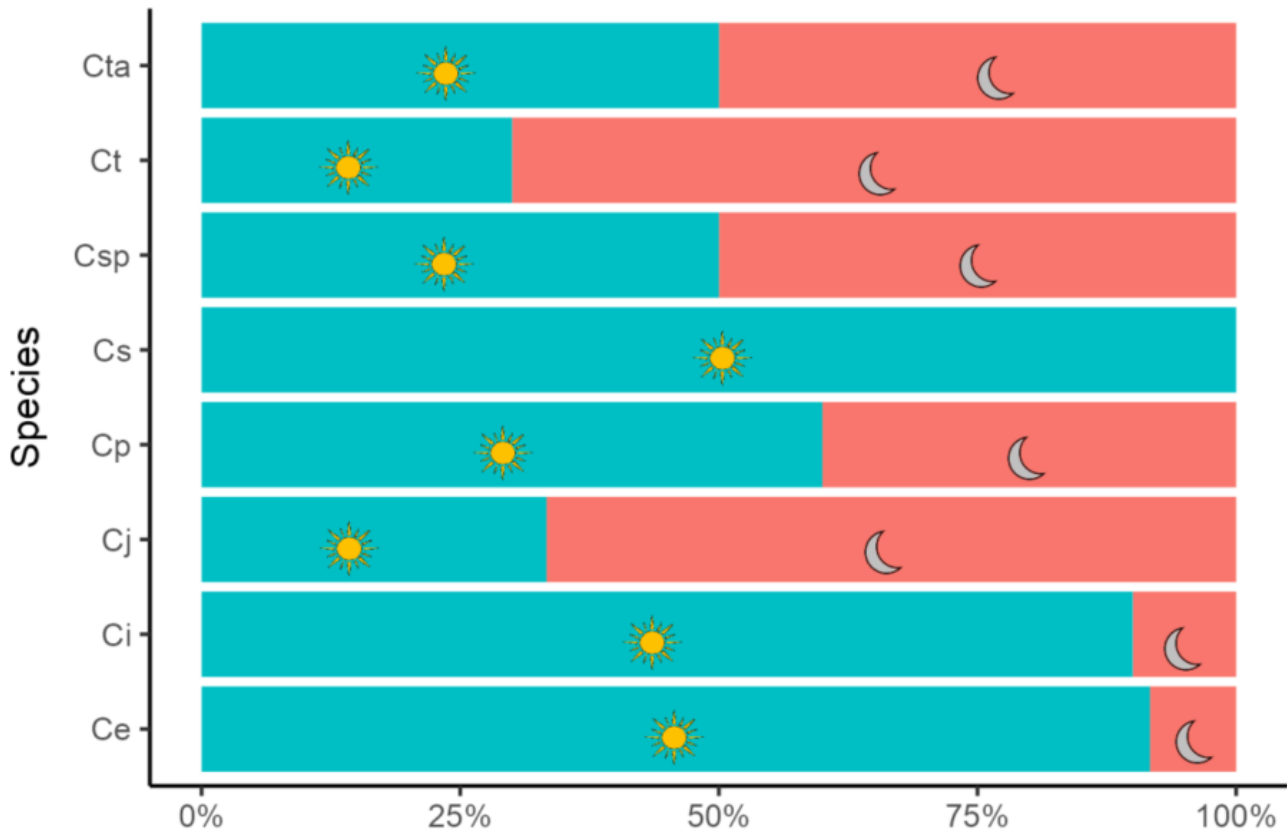


Figura 49. Diferença percentual na atividade locomotora entre indivíduos de espécies troglóbias e troglófilas de *Charinus* em resposta à condição claro-escuro (12h Claro - 12h Escuro). Cta = *C. taboa*; Ct = *C. troglobius*; Csp = *C. spelaeus*; Cs = *C. santanensis*; Cp = *C. potiguar*; Cj = *C. jibaossu*; Ci = *C. iuiu*; Ce = *C. eleonora*.

- De maneira geral, não houve diferenças significativas em elementos rítmicos entre espécies troglófilas e troglóbias, contradizendo assim as hipóteses do estudo. Além disso, as diferenciações em elementos rítmicos entre espécies não foram claramente discerníveis, sugerindo que uma compreensão mais abrangente pode ser alcançada por meio de análise individual ou quando segregadas por idade e sexo, potencialmente revelando correlações. Além disso, um subconjunto de indivíduos exibiu ritmos infradianos, enquanto outros exibiram ritmos circadianos, dificultando conclusões definitivas sobre o fenótipo circadiano dessas espécies que vivem em cavernas (Beale et al. 2016).

#### 3.7.4 Considerações finais

As espécies de *Charinus* que habitam cavernas, submetidas a tratamentos experimentais de luz constante (LL), escuridão constante (DD) e ciclos alternados

de luz e escuridão (LD) neste estudo não exibiram distinções claras em seus ritmos entre espécies troglófilas e troglóbias. Esses resultados ressaltam a dinâmica complexa envolvida na determinação e evolução dos ritmos circadianos dentro dessas populações. Além disso, variações individuais nos padrões de atividade foram observadas, indicando uma diversidade nos perfis comportamentais dessas espécies. A competição por recursos alimentares, provavelmente intensificada pelas restrições oligotróficas observadas em cavernas, surge como um fator potencial que molda esses padrões. Enquanto alguns organismos mantêm um ciclo circadiano, sua expressão se mostra variável, contradizendo expectativas anteriores e destacando a presença de ritmos infradianos. Isso desafia pesquisas anteriores sobre comportamento cronobiológico em cavernas, especialmente entre troglóbios. Além disso, as análises ressaltam a importância de adotar uma abordagem mais individualizada e considerar zeitgebers não fóticos para uma compreensão abrangente e refinada dos ritmos neste grupo de organismos.

### **3.8. O meio subterrâneo superficial e a conectividade biológica no sistema ferrífero de Carajás**

Este subprojeto resultou na Tese de Doutorado de Daniel Reis Maiolino de Mendonça, analista ambiental do ICMBio/Cecav. Ela foi defendida e aprovada em novembro de 2023, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade de Brasília (UnB). A tese está disponível no repositório da UnB, no link <http://repositorio2.unb.br/jspui/handle/10482/47750>, e também consta nos anexos a este relatório.

- A Tese foi dividida em dois capítulos. O primeiro abordou a fauna subterrânea de artrópodes que ocupa os vazios da matriz rochosa que envolve as cavernas ferruginosas na região de Carajás, estado do Pará, por meio de uma abordagem inovadora envolvendo amostragem com armadilhas em furos de sondagem. O segundo capítulo avaliou a estruturação populacional de um diplópode troglóbico (*Pseudoporatia* sp., Diplopoda: Pyrgodesmidae) com ampla distribuição em cavernas na Formação Ferrífera Carajás por meio de análises

filogenéticas e filogeográficas baseadas no gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (cox1).

A seguir, apresentamos os destaques e principais resultados do subprojeto.

### 3.8.1. Resumo geral

Baseado na amostragem da fauna subterrânea de artrópodes que ocupa os vazios da matriz rochosa que envolve as cavernas, o chamado Meio Subterrâneo Superficial (MSS), este trabalho teve como objetivo geral descrever o papel do MSS na dispersão da fauna subterrânea na formação ferrífera de Carajás. Para descrever a estrutura da comunidade e os padrões de distribuição de artrópodes do MSS de acordo com o tipo de isca utilizado, a profundidade e a sazonalidade climática na Formação Ferrífera de Carajás, a metodologia aplicada baseou-se na instalação de armadilhas em furos de sondagem a fim de amostrar os animais que estão transitando pelas descontinuidades do MSS de acordo com tipo de isca utilizada, profundidade e sazonalidade climática. A amostragem total de artrópodes subterrâneos resultou na coleta de 63 táxons. O tipo de isca influenciou significativamente a comunidade de aranhas e ácaros, a profundidade apresentou relação significativa com a riqueza da fauna total, bem como outros grupos como Aranae e Colembolla. Por sua vez, a sazonalidade climática afetou significativamente ácaros, dípteros e coleópteros, devido à variação nos índices pluviométricos, mas principalmente à variação na proporção da zona vadosa e zona saturada no maciço. A riqueza e composição de espécies foram afetadas significativamente pelas três variáveis analisadas. As médias da riqueza e composição de espécies das amostras entre os furos de sondagem não evidenciaram a formação de agrupamentos, indicando uma ausência de estruturação da comunidade de artrópodes do platô analisado. A fim de analisar a estruturação genética entre diferentes cavernas na Formação Ferrífera Carajás foram coletadas amostras de *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae), encontrada comumente em cavernas ao longo da paisagem. Seu material genético foi extraído e hierarquizado, a fim de observar a existências de populações estruturadas ou até espécies crípticas. A análise filogenética de *Pseudoporatia* sp. foi realizada com base em 198 sequências do gene

mitocondrial Citocromo Oxidase I - COI. Baseado no mapa de haplótipos e no número de mutações observadas entre as populações, foi possível verificar que o morfótipo estudado apresenta pouca ou nenhuma estruturação genética populacional dentro de um mesmo platô ou serra. Contudo, de forma contrária, as populações de áreas disjuntas podem ser compostas por um pool de espécies crípticas morfológicamente relacionadas, mas geneticamente diferentes. Estes resultados sugerem a conectividade biológica subterrânea em platôs contínuos e demonstram a necessidade de considerar o MSS nos levantamentos faunísticos na compatibilização da conservação da fauna subterrânea e o desenvolvimento de atividades minerárias na Floresta Nacional de Carajás, a fim de evitar a perda líquida de espécies.

### 3.8.2. Introdução geral

No Brasil, existem seis áreas com formação ferrífera, localizadas nos estados de Minas Gerais (Quadrilátero Ferrífero, Vale do Peixe Bravo e bacia do rio Santo Antônio), Pará (Formação Carajás), Mato Grosso do Sul (Formação Urucum) e Bahia (Caitité) (Carmo 2010, Carmo & Kamino 2015, Zampaulo 2015), sendo as áreas do Quadrilátero Ferrífero e a Serra de Carajás as duas áreas mais importantes em termos de produção de minério de ferro e número de cavernas (Figura 50).

As formações ferruginosas são áreas com grandes depósitos de minério de ferro e são consideradas de importância econômica e de uso conflitivo. A utilização do ferro em larga e a extração do minério leva à perda ou degradação de elementos como o relevo, a paisagem, a capacidade de recarga dos aquíferos e a biodiversidade, ou seja, altera o equilíbrio ecológico deste ambiente.

Ferreira (2005) descreveu a presença de canalículos como uma extensa rede de espaços consolidados e conectados às cavernas, originado por descontinuidades da própria rocha (Figura 50). A presença dessas conexões subterrâneas seria uma característica marcante nos sistemas subterrâneos ferruginosos (Souza-Silva et al. 2011). Alguns pesquisadores relataram a ocorrência de artrópodes no interior de canalículos (Andrade & Saback 2015, Soares et al. 2016), mas ainda são poucas as publicações sobre o tema.



Figura 50. Localização dos geossistemas ferruginosos do Brasil (SOUZA e CARMO, 2015), à esquerda. Testemunho de furo de sondagem de canga em Carajás evidenciando os canalículos e demais falhas presentes no subsolo interceptadas pelos furos de sondagem (direita).

Pesquisas focadas em padrões ecológicos que tragam uma compreensão mais ampla sobre a distribuição das espécies no sistema subterrâneo ferruginoso e que contribuam para a interface entre conservação e mineração ainda são escassas. Nesta perspectiva, esses estudos contribuem também para o licenciamento ambiental, na medida em que podem aprimorar o instrumento denominado Área de Influência de caverna estabelecido pela Resolução CONAMA 347/2004. Em outras palavras, são necessárias abordagens metodológicas para entender os habitats subterrâneos como um todo, não apenas as cavernas, considerando o conjunto de elementos bióticos e abióticos.

Tendo em vista a possibilidade de conectividade subterrânea na paisagem ferrífera, este trabalho abordou a conservação do ecossistema de campos ferruginosos na Amazônia com base na utilização de técnicas de amostragem e análise de dados ecológicos e genéticos para a proposição de modelos de conservação da paisagem.

A área de estudo englobou a Formação Ferrífera de Carajás, no Estado do Pará, no bioma Amazônico. As atividades de campo ocorreram na Serra Norte e Serra Sul, localizadas dentro da Floresta Nacional (FLONA) de Carajás; Serra da Bocaina, dentro do Parque Nacional (PARNA) dos Campos Ferruginosos, e Serra Leste, localizada fora de unidade de conservação (Figura 51).

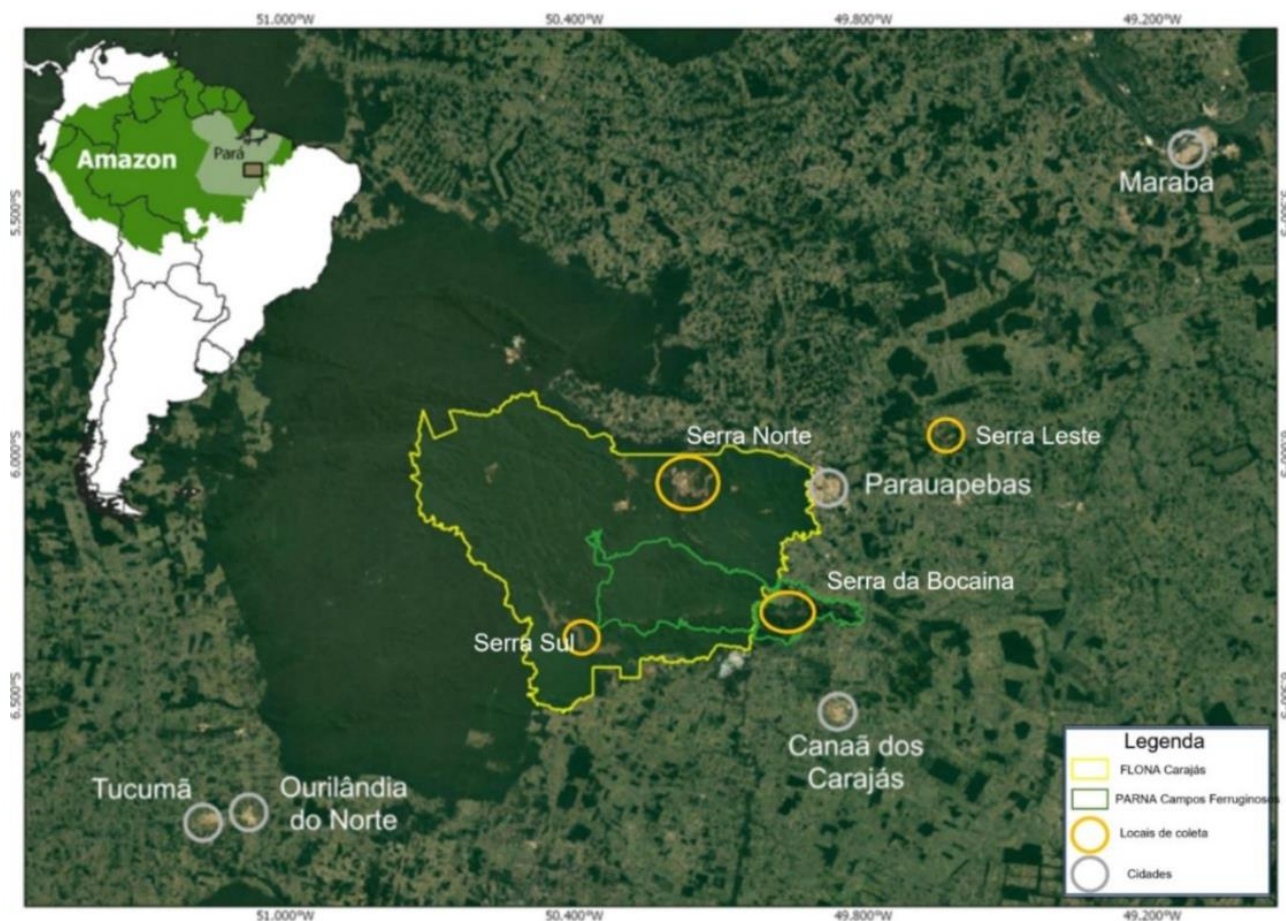


Figura 51. Localização da FLONA Carajás (em amarelo), PARNA Campos Ferruginosos (em verde), respectivas Serras (círculos em laranja) e sede dos municípios (círculos brancos).

No que se refere ao desenvolvimento da paisagem, a Formação Ferrífera de Carajás apresenta um padrão de relevo marcado pela presença de serras de topos aplainados, denominados de Planaltos Residuais do Sul da Amazônia (Valentim & Olivito 2011) e destaca-se pelo compartimento de topo das serras acima de 700 m, sustentado pela formação ferrífera e pelas coberturas de canga, caracterizado pela vegetação com fisionomia típica do bioma Cerrado (Piló et al. 2015). Além da superfície de topo, merecem destaque as bordas dos platôs, onde a paisagem está sendo erodida pelo intemperismo, revelando cavidades anteriormente oclusas (Piló et al. 2015). Nesta área, a ocorrência das formações

ferríferas e sua evolução promoveram o desenvolvimento de diferentes unidades da paisagem (Figura 52).

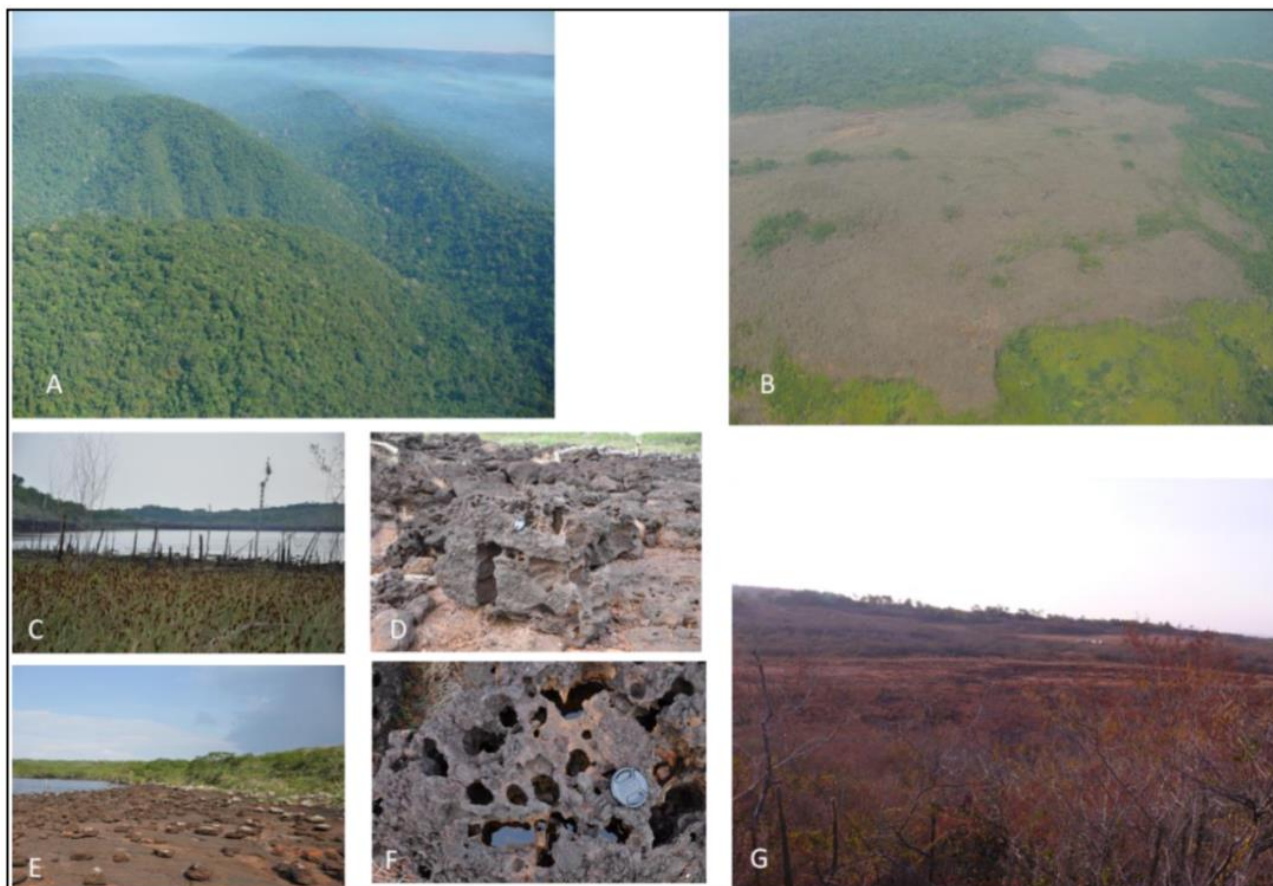


Figura 52. A - Matriz florestal nas áreas onde não ocorre a formação ferrífera; B - Vista geral do topo de um platô na região de Carajás; C - Lagoas; D e E - Campos rupestres; F - Canga, evidenciando sua porosidade, e G - Formação savânica típica de topo de platô durante a estação seca.

3.8.3. A comunidade de artrópodes associada ao Meio Subterrâneo Superficial (MSS) no sistema ferrífero de Carajás e a influência de fatores ecológicos estruturantes

Trata-se do primeiro capítulo da Tese, tendo resultado ainda em outras publicações (Figura 53) tais como um resumo expandido publicado no 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia, em 2019, que pode ser acessado pelo link [https://www.cavernas.org.br/wp-content/uploads/2021/07/35cbe\\_590-598.pdf](https://www.cavernas.org.br/wp-content/uploads/2021/07/35cbe_590-598.pdf); um artigo publicado na Revista Brasileira de Espelologia, em 2023, que pode ser acessado pelo link <https://revistaeletronica.icmbio.gov.br/rebe/article/view/2365>; um resumo expandido específico sobre a fauna de colêmbolos, publicado no 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia, em 2023, que pode ser acessado pelo link

[http://www.cavernas.org.br/anais37cbe/37cbe\\_008-014.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais37cbe/37cbe_008-014.pdf); e ainda um resumo publicado no Congresso de Gestão do Conhecimento e Sociobiodiversidade das Áreas Protegidas de Carajás – CGBio, em 2024, disponível no link <https://www.even3.com.br/anais/cgbio/709882-a-amostragem-da-fauna-subterranea-em-cavernas-e-suficiente-para-evitar-perda-liquida-de-especies-no-meio-subterra/>. Todas as publicações constam nos anexos a este relatório.

**35º ANAI do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia**  
Bonito-MS | 19-22 de julho de 2019 - ISSN 2178-2113 (online)

O artigo a seguir é parte integrante dos Anais do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br).

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

MENDONÇA, D.R.M. et al. Nova abordagem na caracterização ecológica da fauna subterrânea associada aos canaliculos em formação ferrífera no sudeste do estado do Pará. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 35, 2019. Bonito. *Anais...* Campinas: SBE, 2019. p.590-598. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe\\_590-598.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_590-598.pdf)>. Acesso em: data do acesso.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia. Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)

---

**ANAI do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia**  
Bonito/MS, 19-22 de junho de 2019 – Sociedade Brasileira de Espeleologia

**NOVA ABORDAGEM NA CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA DA FAUNA SUBTERRÂNEA ASSOCIADA AOS CANALÍCULOS EM FORMAÇÃO FERRÍFERA NO SUDESTE DO ESTADO DO PARÁ**  
NEW APPROACH IN THE ECOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SUBTERRANEAN FAUNA ASSOCIATED TO THE MESO-CAVITIES IN IRON FORMATION IN THE SOUTHEAST OF PARÁ STATE

Daniel Reis Maiolino de MENDONÇA (1,2); Tiago Castro SILVA (1); Fernando Pacheco RODRIGUES (2); Rodrigo Lopes FERREIRA (3)

(1) Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Cavernas/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade  
(2) Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.  
(3) Departamento de Ecologia da Universidade Federal da Lavras.

Contatos: [daniel\\_mendonca@icmbio.gov.br](mailto:daniel_mendonca@icmbio.gov.br); [tiago-castro.silva@icmbio.gov.br](mailto:tiago-castro.silva@icmbio.gov.br); [fprodrigues@unb.br](mailto:fprodrigues@unb.br); [drops@dfi.ufba.br](mailto:drops@dfi.ufba.br)

**37º ANAI do 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia**  
Curitiba - Paraná, 26 a 29 de julho de 2023

O artigo a seguir é parte integrante dos Anais do 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia, disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br).

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

MENDONÇA, D. R. M.. Fauna de colêmbolos do meio subterrâneo superficial (MSS) na Formação Ferrífera de Carajás, Amazônia brasileira. In: MISE, K. M.; GUIMARÃES, G. B. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 37, 2023. Curitiba. *Anais...* Campinas: SBE, 2023. p.008-014. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais37cbe/37cbe\\_008-014.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais37cbe/37cbe_008-014.pdf)>. Acesso em: data do acesso.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia. Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)

---

**ANAI do 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia**  
Curitiba - Paraná, 26 a 29 de julho de 2023 – Sociedade Brasileira de Espeleologia

**FAUNA DE COLÊMBOLOS DO MEIO SUBTERRÂNEO SUPERFICIAL (MSS) NA FORMAÇÃO FERRÍFERA DE CARAJÁS, AMAZÔNIA BRASILEIRA**  
SPRINGTAILS OF MILIEU SOUTERRAIN SUPERFICIAL IN THE CARAJÁS IRON FORMATION, BRAZILIAN AMAZON

Daniel Reis Maiolino de MENDONÇA (1)

(1) Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas -CECAV/ICMBio.

Contatos: [daniel\\_mendonca@icmbio.gov.br](mailto:daniel_mendonca@icmbio.gov.br)

**CECAV** Revista Brasileira de Espeleologia – RB Esp  
ISSN 2179-4952 - V.01 – Nº. 12 – 2023  
Recebido: 20 de dezembro de 2022. Aceito: 22 de dezembro de 2022. Publicado: 31 de julho de 2023

**EFICIÊNCIA DE ISCAS NA COLETA DE ARTRÓPODOS ENCONTRADOS NO MEIO SUBTERRÂNEO SUPERFICIAL EM FORMAÇÃO FERRÍFERA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.**  
EFFICIENCY OF BAIT TO COLLECT ARTHROPODS IN THE SUB-SUPERFICIAL HABITAT IN THE BRAZILIAN AMAZON FOREST IRON FORMATION

Daniel Reis Maiolino de Mendonça  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio  
E-mail: [daniel\\_mendonca@icmbio.gov.br](mailto:daniel_mendonca@icmbio.gov.br)

Fernando Pacheco Rodrigues  
Universidade de Brasília - UnB  
E-mail: [fprodrigues@unb.br](mailto:fprodrigues@unb.br)

Gilson Argolo  
Universidade Federal de Lavras  
E-mail: [gilsonr\\_2006@hotmail.com](mailto:gilsonr_2006@hotmail.com)

Marconi Sousa-Silva  
Universidade Federal de Lavras  
E-mail: [marconsilva@ufba.br](mailto:marconsilva@ufba.br)

Rodrigo Lopes Ferreira  
Universidade Federal de Lavras  
E-mail: [drops@ufba.br](mailto:drops@ufba.br)

**ICMBio** Congresso de Gestão do Conhecimento e Sociobiodiversidade das Áreas Protegidas de Carajás

**CGBio**  
Congresso de Gestão do Conhecimento e Sociobiodiversidade das Áreas Protegidas de Carajás

APOIO PATROCÍNIO VALE

**A AMOSTRAGEM DA FAUNA SUBTERRÂNEA EM CAVERNAS É SUFICIENTE PARA EVITAR PERDA LÍQUIDA DE ESPÉCIES NO MEIO SUBTERRÂNEO NA FORMAÇÃO FERRÍFERA DE CARAJÁS?**

Daniel R.M. Mendonça <sup>(1)</sup>

(1) Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas - CECAV/ICMBio

Figura 53. Resumos expandidos (acima), artigo (abaixo, à esquerda) e resumo (abaixo, à direita) resultantes do estudo descrito no primeiro capítulo da tese.

A seguir, apresentamos o resumo e os principais destaques do primeiro capítulo da tese.

### Resumo

Alguns estudos realizados em formações ferríferas no Brasil apontam para a existência de uma fauna subterrânea diversificada. A exploração do sistema subterrâneo normalmente é restrita às cavernas, contudo, a evolução de estudos e o surgimento de ameaças à conservação destes ambientes geram a

necessidade de aprimoramento nas técnicas e abordagens mais amplas, além do ambiente cavernícola. Desta forma este trabalho buscou analisar a influência da profundidade e da sazonalidade climática na estrutura da comunidade de artrópodes que ocupam o Meio Subterrâneo Superficial (MSS) da formação ferrífera de Carajás/PA. O método de coleta foi testado quanto à eficiência de diferentes tipos de isca. A metodologia aplicada baseou-se na instalação de armadilhas em furos de sondagem a fim de amostrar os invertebrados que transitam pelas discontinuidades do MSS testando sua distribuição espacial de acordo com profundidade, sazonalidade climática e tipo de isca utilizado. Foram inseridas 5 armadilhas em 24 furos de sondagem previamente perfurados totalizando 120 armadilhas em cada estação. Os dados obtidos foram relacionados com variáveis como profundidade, tipo de isca e sazonalidade. A amostragem total de artrópodes subterrâneos resultou na coleta de 63 táxons, distribuídos em 5 Classes e 13 Ordens. Ácaros, colembolos e coleópteras foram os grupos mais diversos, além de mais bem distribuídos na amostragem. A profundidade apresentou relação negativa significativa com a riqueza da fauna total, bem como para grupos específicos como Araneae e a Collembola. O tipo de isca influenciou significativamente na coleta de espécies de aranhas e ácaros. A sazonalidade por sua vez afetou significativamente a presença de ácaros, dípteras e coleópteras. A composição de espécies demonstrou-se afetada significativamente pelas três variáveis analisadas, evidenciando sua influência na estruturação da comunidade. Foi possível observar que, de acordo com a similaridade com base na riqueza e composição de espécies, amostras de um mesmo furo se mostraram mais similares do que amostras de furos diferentes. Contudo este agrupamento mostra uma estruturação muito fraca, evidenciando que não existem barreiras que levem a uma comunidade de artrópodes do platô analisado.

### *Objetivo geral*

Descrever a estrutura da comunidade de artrópodes do MSS de acordo com variáveis ambientais e analisar a similaridade de espécies subterrâneas em um platô na Formação Ferrífera de Carajás.

### *Objetivos específicos*

- Testar o efeito do tipo de isca utilizado sobre a riqueza e composição observadas;
- Testar o efeito da profundidade sobre a riqueza e composição de espécies observadas;
- Testar o efeito da sazonalidade climática sobre a riqueza e composição observadas;
- Analisar a similaridade da comunidade do MSS ao longo da paisagem estudada.

### *Destaques e resultados*

- Os habitats subterrâneos são muito mais amplos do que apenas as cavernas, e espécies troglóbias podem utilizá-los de diferentes maneiras. Dentre os diversos tipos habitats subterrâneos, o que mais se assemelha às condições encontradas em formações ferríferas é o Meio Subterrâneo Superficial (MSS). Este corresponde a uma camada de fragmentos de rocha de diversos tamanhos, recobertos com uma camada de folhiço que mantém a umidade e permite a entrada de organismos por meio de diversos pontos de fratura do material encontrado entre a superfície e a rocha sã. O MSS é frequentemente conectado tanto com o domínio hipógeo profundo, como cavernas e rachaduras profundas na rocha, quanto com o horizonte superficial do solo. Ademais, compartilham várias características ecológicas com cavernas, como ausência de luz, baixo fluxo de energia e uma relativa estabilidade microclimática (Mammola et al. 2016).

- Uma das diferenças marcantes entre as diversas litologias existentes é a potencial conectividade existente entre as macrocavernas. Essa permeabilidade da rocha, especialmente nas carapaças de canga, indica a possibilidade de trânsito da fauna no meio subterrâneo em sistemas ferruginosos (Ferreira 2005, Souza-Silva et al. 2011, Ferreira et al. 2015; Piló et al. 2015). Estes autores observaram que conexões subterrâneas por meio de descontinuidades estruturais permitem que diversas espécies, especialmente as troglóbias, possam apresentar

distribuições mais amplas, chegando a ocupar serras inteiras ou até mesmo diferentes unidades geomorfológicas (Ferreira 2015).

- A realização de sondagens para mapeamento geológico em empreendimentos minerários dá a oportunidade de acesso a este sistema subterrâneo, complementando o levantamento faunístico realizado nas macrocavidades. Assim, a utilização de metodologias de amostragem em furos de sondagem perfurados em depósitos de minério de ferro para coletar fauna subterrânea presente no MSS é essencial para o conhecimento e entendimento destes habitats, bem como para a real compreensão de como estas comunidades são estruturadas (Ferreira et al. 2015).

- A atividade de campo do capítulo foi desenvolvida na Floresta Nacional de Carajás/PA, no platô da Serra Norte denominado N3 (Figura 54). Armadilhas de colonização com diferentes tipos de isca foram instaladas em furos de sondagem a fim de amostrar a fauna subterrânea que não ocupa apenas as cavernas, mas também o MSS. O desenho amostral está ilustrado na figura 55.

- Para os pontos de coleta, optou-se por utilizar furos de sondagem já existentes ao longo do platô N3, uma vez que foram feitos para a realização de pesquisas para verificação do potencial minerário do local, formando uma malha de furos cada vez mais próximas. Estes furos encontram-se permanentemente fechados de maneira a diminuir a variação dos elementos abióticos (temperatura e umidade), bem como dificultar o contato de espécies da superfície. Os furos utilizados na pesquisa foram perfurados semanas antes da colocação das armadilhas e encontravam-se em bom estado de conservação, diminuindo os custos do projeto. A localização dos furos de sondagem onde foram inseridas as armadilhas está representada na figura 56.

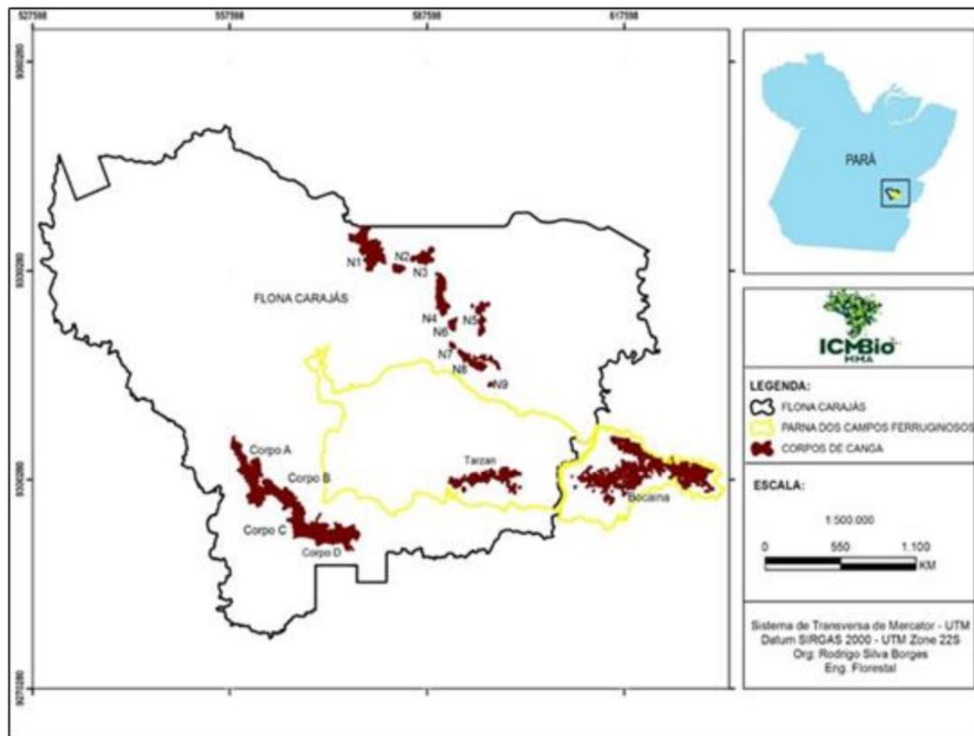


Figura 54. Localização dos platôs da FLONA Carajás, incluindo N3. Fonte: ICMBio, 2018.

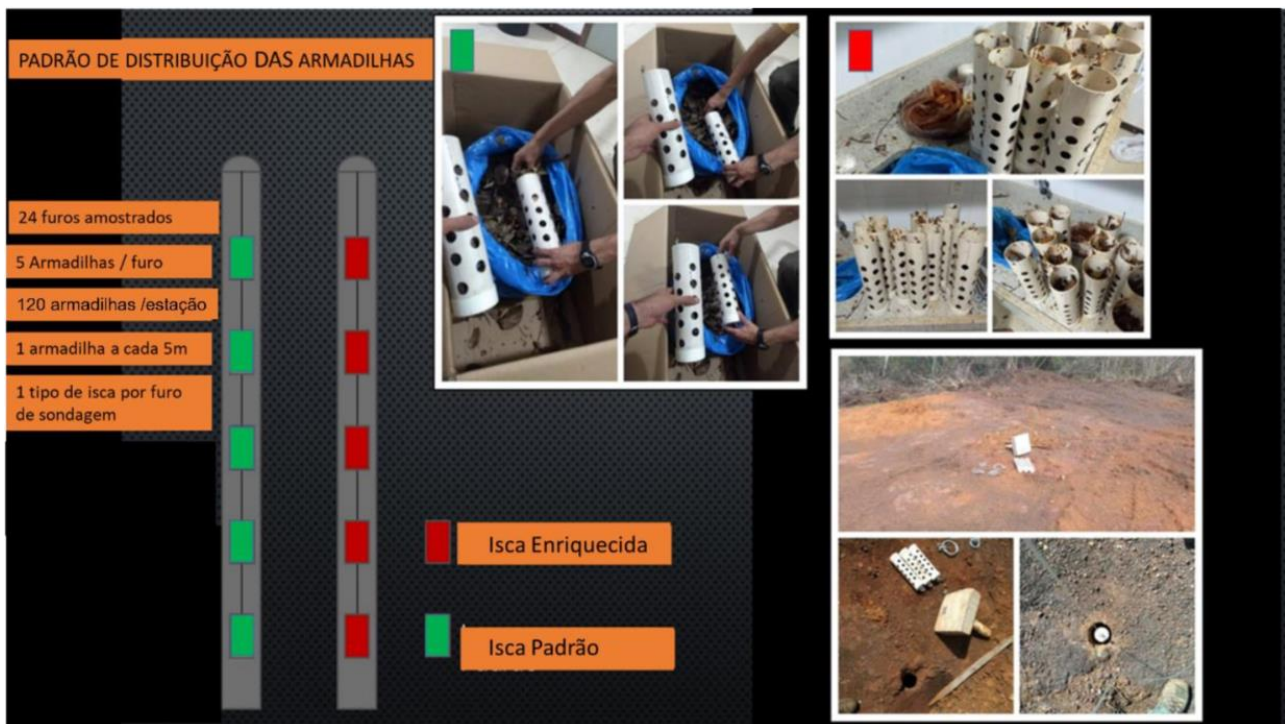


Figura 55. Desenho amostral da distribuição das armadilhas. A isca padrão é composta apenas por folhço local esterilizado e a isca enriquecida corresponde a este folhço acrescido de fígado moído.

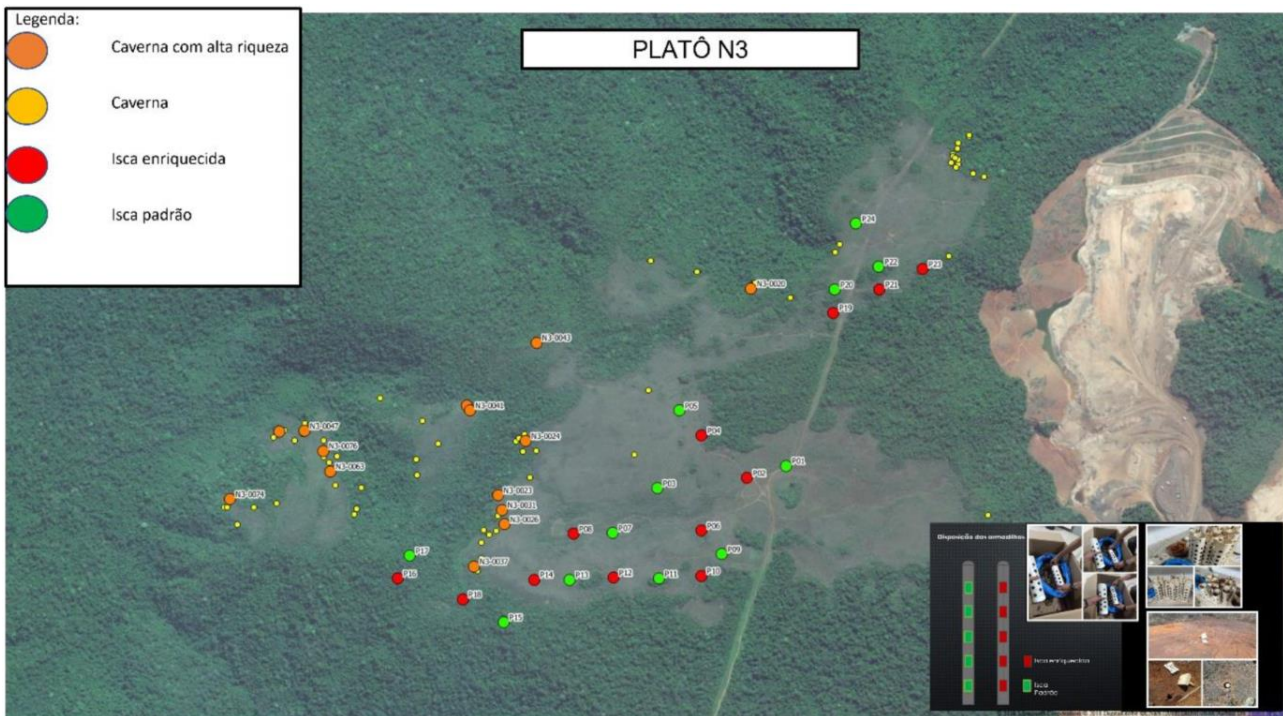


Figura 56. Localização dos pontos de coleta em N3 de acordo com o tratamento utilizado. Pontos em vermelho representam os furos que continham isca enriquecida. Os pontos em verde representam os furos com iscas padrão, em amarelo são as cavernas e em laranja, as cavernas com alta riqueza de espécies.

- Foram utilizadas 120 armadilhas, inseridas nos períodos chuvoso e no seco, totalizando, portanto, 240. As armadilhas foram dispostas em grupos de 5 por furo, distantes 5 metros entre si, especialmente distribuídas em 24 furos de sondagem selecionados. As armadilhas permaneceram nos furos de sondagem por 8 semanas. Com a utilização destas armadilhas e a partir do desenho amostral proposto, a riqueza e composição de espécies podem ser correlacionados ao nível de armadilha ou furos de sondagem considerando-se os tipos de isca, as estações climáticas e a profundidade das amostras.

- Foram coletados organismos pertencentes a diversos táxons como Oligochaeta, Gastropoda e Tricladida. Contudo, foram analisados apenas artrópodes. A amostragem total de artrópodes subterrâneos resultou na coleta de 63 táxons, distribuídos em 5 classes e 13 ordens. As classes de artrópodes coletados foram: Arachnida, Entognatha, Insecta, Crustacea e Miriapoda. Arachnida foi marcada pela alta riqueza de espécies de ácaros (20 morfotipos), seguida de Araneae (quatro morfotipos) e Opiliones (um morfotipo).

- De forma geral, a riqueza total não apresentou relação significativa com o tipo de isca utilizada. No entanto, ao analisar grupos específicos, a riqueza de Araneae foi maior nas armadilhas com iscas padrão, enquanto para os ácaros a riqueza foi maior nas armadilhas com iscas enriquecidas.

- Ao se observar a distribuição vertical das espécies coletadas em todas as amostras, foi possível perceber uma riqueza decrescente a partir da superfície, evidenciando que as armadilhas superficiais, independentemente do tipo de isca utilizada, apresentam uma maior riqueza de espécies do que as armadilhas mais profundas. Assim, a profundidade é um fator estruturante e tem uma influência negativa sobre a riqueza total de artrópodes subterrâneos (Figura 57). De forma complementar, dos 63 taxons coletados, apenas três apresentaram troglomorfose aparente. Isso indica que a maioria das espécies que ocorrem no MSS faz parte da fauna epígea e, portanto, com pouca adaptação aos habitats subterrâneos.

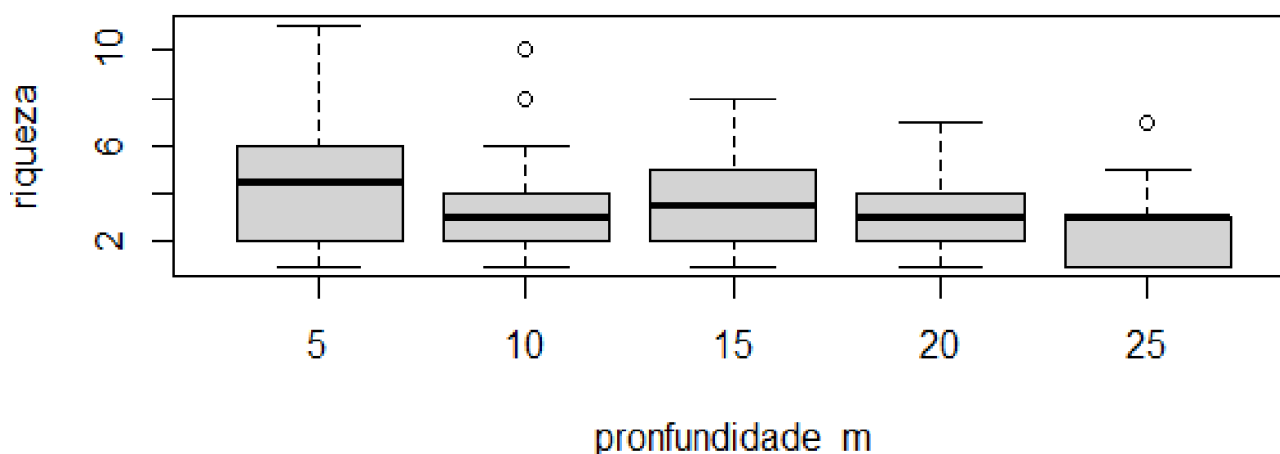


Figura 57. Boxplot da relação entre a riqueza total de morfótipos que utilizam o habitat subterrâneo em relação às profundidades estudadas ( $R^2= 0.07078$ ,  $P\text{-value} < 0.001^*$ ).

- A fauna total não apresentou uma tendência única para a sazonalidade. Contudo, a riqueza de morfoespécies de ácaros foi maior na estação seca enquanto as de Diptera e Coleoptera foram maiores na estação chuvosa. Devido à pequena riqueza de morfoespécies troglomórficas, não foi possível verificar alguma relação ecológica entre estas espécies e as variáveis testadas.

- A composição de espécies também foi influenciada. Análises de LME apontaram relações significativas entre a diversidade e alguns fatores avaliados,

sendo negativa com a profundidade e positiva com o uso de isca padrão (não enriquecida) e com a estação seca.

- Três morfoespécies apresentaram alguma característica troglomórfica, o Collembola *Cyphoderus* sp.1, encontrado em onze armadilhas, o besouro *Copelatus* sp. nov., encontrado em três, e o Miriapoda Pyrgodesmidae sp.1, encontrado em apenas uma (Figura 58). Além disso, após análises realizadas por especialistas em alguns grupos taxonômicos, foi possível detectar algumas espécies ainda não descritas coletadas neste trabalho (Figura 58). Estudos posteriores permitirão a descrição formal das novas espécies



Figura 58: Espécies encontradas com alguma característica troglomórfica, *Cyphoderus* sp.1 (acima à esquerda), *Copelatus* sp. nov. (acima, ao centro), *Pyrgodesmidae* sp.1 (acima, à esquerda). Abaixo são apresentadas algumas possíveis novas espécies identificadas no estudo.

- Ao plotar a ocorrência das espécies novas ou troglomórficas no mapa da área de estudo, podemos notar uma distribuição ampla, principalmente em *Copelatus* sp. nov e *Cyphoderus* sp.1, ambos os táxons com características troglomórficas (Figura 59). Isso é um bom indicativo de possível conectividade dos habitats subterrâneos na área estudada.

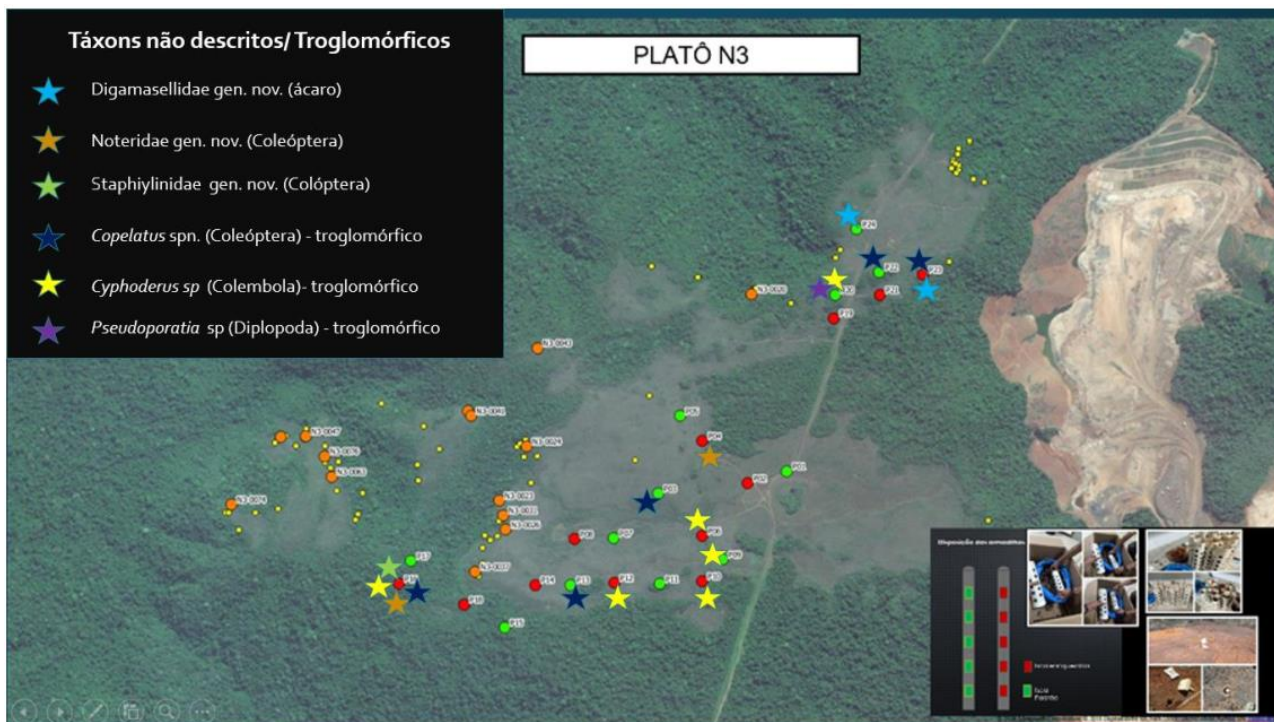


Figura 59: Ocorrência de táxons novos e troglomórficos encontrados na área de estudo.

- Os resultados aqui apresentados corroboram com o trabalho de Zeppelini et al. (2018), ao apontarem que a legislação brasileira tem foco antropocêntrico, pois considera apenas a possibilidade de levantamento da fauna subterrânea em locais acessíveis ao ser humano, reduzindo as oportunidades de estudos e compreensão do meio subterrâneo como um todo.

- A ocorrência de táxons troglomórficos e ainda não descritos nos furos de sondagem demonstra a que a manutenção de áreas de MSS, que promovem a heterogeneidade de nichohabitats e a possível conectividade subterrânea entre macrocavidades, pode ser tão importante quanto a manutenção de cavernas quando se abordam estratégias de conservação da fauna subterrânea. Dessa forma, a amostragem de espécies em apenas uma parte do ambiente subterrâneo (cavernas), principalmente para licenciamento ambiental de

atividades que ameaçam o patrimônio espeleológico, não é suficiente para avaliar adequadamente sua biodiversidade e pode levar à perda de espécies, devendo ser aprimorada.

3.8.4. Análise da estrutura genética de populações de *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae) na Formação Ferrífera de Carajás como indicativo de conectividade do habitat subterrâneo

Trata-se do segundo capítulo da Tese, e avaliou a estruturação populacional de um diplópode troglóbico (*Pseudoporatia* sp., Diplopoda: Pyrgodesmidae) com ampla distribuição em cavernas na Formação Ferrífera Carajás por meio de análises filogenéticas e filogeográficas baseadas no gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (cox1). A seguir, apresentamos os principais destaques do estudo.

#### *Resumo*

A capacidade de uma determinada espécie de manter uma ampla distribuição espacial aumenta a chance dela se manter ao longo do tempo. Esta premissa também influencia a longevidade de uma espécie que depende do meio subterrâneo. As formações ferríferas, como por exemplo a Formação Carajás, apresentam características geológicas que resultam em um conjunto de serras e platôs independentes na paisagem contendo em seu subsolo fissuras, descontinuidades e canais diminutos, que define o Meio Subterrâneo Superficial (MSS). Este fato explicaria, especialmente para a litologia ferrífera, casos de ampla distribuição espacial de espécies troglóbicas, ou seja, que vivem exclusivamente no ambiente subterrâneo, incapazes de apresentar populações viáveis na superfície. Neste contexto, a utilização de uma abordagem molecular em populações de espécies com estas características contribui para esclarecer a funcionalidade ecológica destas conectividades analisando a diversidade genética encontrada em populações em nível local e regional, uma vez que a paisagem, composta por platôs ferríferos disjuntos, seria suficiente para impedir a observação de estruturação genética nas populações amostradas. Após a coleta e morfotipagem das amostras de *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae) encontradas em cavernas ao longo da paisagem, seu material

genético foi extraído e hierarquizado, a fim de observar a existências de populações estruturadas ou espécies crípticas por meio de análises utilizando-se o DNA Barcode. A análise filogenética de *Pseudoporatia* sp. foi realizada com base nos grupos de sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I – *cox 1*, bastante utilizado em estudos iniciais de espécies não modelo. Após o processamento de 198 amostras foi possível comparar as linhagens por meio de análises filogeográficas tanto em populações amostradas em cavidades de uma mesma serra quanto entre cavernas de serras diferentes. Baseado no número de mutações observadas foi possível verificar que o morfótipo estudado apresenta pouca ou nenhuma estruturação genética populacional dentro de um mesmo platô ou serra. De forma contrária, foi possível observar que as populações de outras serras podem ser compostas por espécies crípticas morfológicamente relacionadas, mas geneticamente diferentes. As informações obtidas podem ser utilizadas para a definição taxonômicas das espécies de *Pseudoporatia* sp. que existem nas diferentes localidades estudadas. O aumento no entendimento do MSS de áreas que envolvam a conservação e a compatibilização com atividades minerárias que ocorrem na Floresta Nacional de Carajás pode definir de uma melhor maneira as necessidades das espécies troglóbias durante a definição de áreas necessárias para sua conservação, a fim de evitar a perda líquida de espécies.

#### *Objetivo geral*

Analisar a estruturação genética entre as linhagens de *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae) de diferentes cavernas na formação ferrífera de Carajás.

#### *Objetivos específicos*

- Analisar a estruturação genética das linhagens de *Pseudoporatia* sp. entre cavernas de uma mesma serra e entre cavernas das diferentes serras na Formação Carajás.

- Gerar informações moleculares para auxiliar a descrição morfológica como subsídio para futuras revisões taxonômicas e verificação de possíveis espécies crípticas de *Pseudoporatia* sp.

- Analisar a distribuição dos haplótipos das amostras de *Pseudoporatia* sp na paisagem e inferir a conectividade biológica do meio subterrâneo

#### *Destaques e resultados*

- Os Diplopoda atualmente compreendem 131 famílias, 1.800 gêneros e 12.000 espécies distribuídas mundialmente. Estes animais representam uma das maiores classes, não somente dentre os Myriapoda, mas também dentre o reino animal. Eles aparentemente são o terceiro maior grupo de Arthropoda terrestre, após os Insecta e os Arachnida (Enghoff et al. 2015). Dezesesseis famílias, 55 a 60 gêneros e 250 espécies descritas ocorrem na Amazônia (Adis 2002), onde ocorrem principalmente em habitats florestais, basicamente no chão da floresta (principalmente serrapilheira e madeira apodrecida). Hábitos fossoriais, redução ou ausência de estruturas oculares e tegumentares, maior capacidade de percepção química (receptores) ou físicas (membros alongados) representam diferenças na morfologia e comportamento que conferem a estes organismos pré-adaptações permitindo a ocupação dos ambientes subterrâneos (Shear 1973).

- Pyrgodesmidae representa uma das maiores e mais conhecidas famílias dentre os diplópodes, com aproximadamente 400 espécies e 170 gêneros (Jorgensen & Sierwald 2010), encontrados principalmente na região Pantropical. As espécies em geral são caracterizadas pelo pequeno tamanho corporal (3-15 mm) e pela presença de collum ampliado, o qual oculta completamente a cabeça em vista dorsal (Hoffman 1982). Existem diversos registros de morfótipos troglomórficos em cavernas brasileiras, todavia a despigmentação e ausência de estruturas oculares são recorrentes na família e isso dificulta a determinação de espécies realmente troglóbias (Golovatch et al. 2006).

- Exemplares de Pyrgodesmidae com características troglomórficas já foram registrados em cavernas na região de Carajás (Carste 2011). Os espécimes

apresentam despigmentação do tegumento, descalcificação da cutícula e alongamento de antenas, carenas e apêndices locomotores. Contudo, a determinação de troglomorfismo é uma tarefa difícil, pois existem variações morfológicas de diferentes estruturas que pode evidenciar esta relação com o ambiente subterrâneo em determinados grupos, mas não para outros. É importante destacar que, embora tais características demonstrem alguma associação ao ambiente subterrâneo, não são determinantes de uma condição troglóbia. Assim, refinamentos taxonômicos, análises moleculares e levantamentos ecológicos no ambiente epígeo são recomendados para confirmar o status ecológico-evolutivo das espécies.

- O sistema subterrâneo em formações ferríferas é marcado pela forte conectividade, tanto entre cavernas quanto entre cavernas e a superfície, seja ela por meio de descontinuidades na rocha, fissuras, fraturas ou canalículos, formando o MSS (Ferreira 2005), como foi visto no primeiro capítulo. Esses fatores influenciam diretamente a possibilidade de estruturação genética nas populações de espécies troglóbias, uma vez que estes animais não são capazes de formar populações viáveis na superfície. Em um contexto mais amplo, a geografia atual das formações ferríferas na região de Carajás auxilia o isolamento entre populações de espécies troglóbias, uma vez que é formada por platôs ferríferos isolados inseridos em uma paisagem de matriz florestal e que impede a conexão física entre as formações ferríferas, impossibilitando assim a passagem subterrânea utilizada obrigatoriamente por estes animais. Desta forma, é esperada uma forte estruturação genética entre as populações de espécies troglóbias encontradas em diferentes platôs.

- A Serra de Carajás, área de estudo deste trabalho, embora esteja parcialmente dentro de uma unidade de conservação federal, possui cavernas localizadas em regiões de exploração mineral, atividade prevista pela UC. Isso acarreta risco constante de supressão ou impactos na área de entorno das cavernas. Nesse contexto, estudos que abordem a real distribuição de espécies e populações, muitas vezes com ocorrência extremamente restrita, auxiliam na gestão do patrimônio espeleológico na região (ICMBio 2018). Assim, estudos com

uso de ferramentas moleculares surgem como uma nova abordagem capaz de caracterizar melhor esses ambientes e detalhar de forma mais ampla a importância da conectividade entre cavernas para a conservação da fauna subterrânea e da paisagem.

- A espécie selecionada corresponde a um diplópoda da família Pyrgodesmidae pertencente ao gênero *Pseudoporatia* (Figura 60) que, devido à sua ampla distribuição na área de estudo, deve se tratar de *P. kananciue* (Iniesta et al. 2023). Outros critérios para a escolha foram a facilidade de identificação visual e coleta. Todo o material coletado nesse estudo, bem como exemplares coletados em estudos de licenciamento ambiental e depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Butantã, foram previamente comparados por especialista no grupo anteriormente ao envio das amostras para extração de DNA. Isso garantiu que o estudo foi realizado com apenas um morfótipo com ampla distribuição nas cavernas de toda a região ferrífera de Carajás. As análises e resultados apresentados a seguir foram baseados em sequências parciais do gene *cox1* de 198 indivíduos coletados em 15 cavernas em Serra Norte (sete no platô N3, cinco no N4 e três no N5), uma em Serra Sul, uma na Serra da Bocaina e uma em Serra Leste.



Figura 60: Exemplar de *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Polydesmida) sobre piso de cavidade. Adaptado de Bioespeleo (2018).

- As relações filogenéticas inferidas por máxima verossimilhança indicam a existência de três clados monofiléticos, geralmente concordantes com a

ocorrência dos indivíduos em cavernas de diferentes serras (com exceção de um indivíduo coletado em uma caverna da Serra Sul, que se agrupou com indivíduos da Serra Norte) (Figura 61). Análises de estimativas de fluxo gênico baseadas em estatística F ( $F_{ST}$ ) também indicaram alta estruturação populacional e ausência de fluxo gênico entre diferentes serras. Isso indica que a formação disjunta entre as serras e platôs em formação ferrífera numa matriz florestal pode representar uma barreira geográfica para a distribuição espacial de espécies troglóbias.

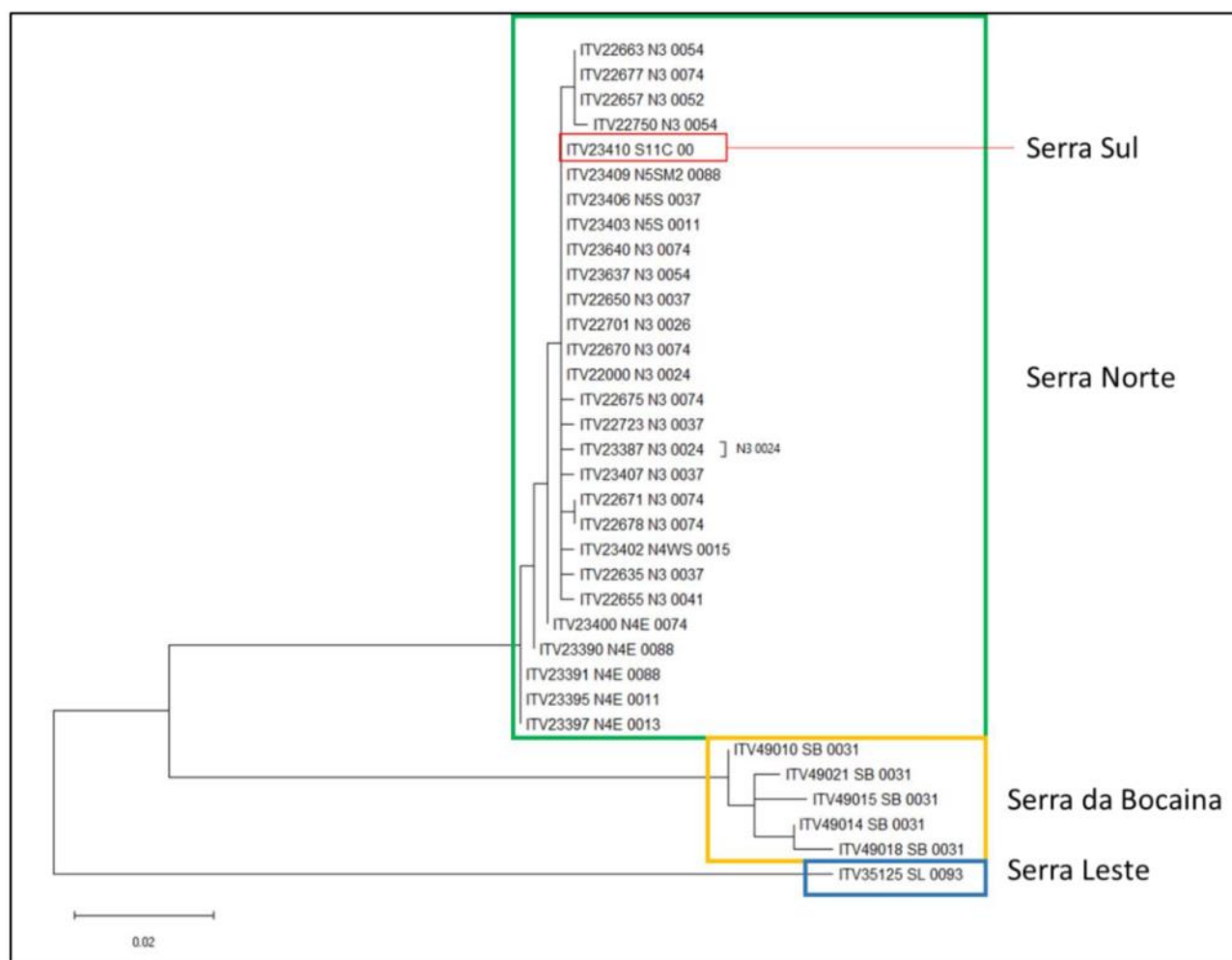


Figura 61: Reconstrução filogenética – máxima verossimilhança. É possível notar a proximidade entre as amostras de cavernas em Serra Norte (polígono verde), bem como notar a divergência entre cavernas de diferentes serras.

- Foi possível observar também uma baixa estruturação populacional em áreas contínuas de formação ferrífera, indicando uma alta conectividade e a possibilidade de migração de indivíduos entre as cavernas de um mesmo platô, ao ponto de não serem observadas diferenciações nas estruturas genéticas entre as populações estudadas.

- Esses resultados são corroborados pela rede de haplótipos, com haplótipos compartilhados entre indivíduos coletados em diferentes cavernas na Serra Norte e Serra Sul. De maneira contrária, indivíduos coletados em cavernas na Serra Leste, ocorrendo o mesmo na Serra da Bocaina, apresentaram haplótipos únicos e separados por vários passos mutacionais daqueles de indivíduos coletados em cavernas nas outras serras (Figura 62).

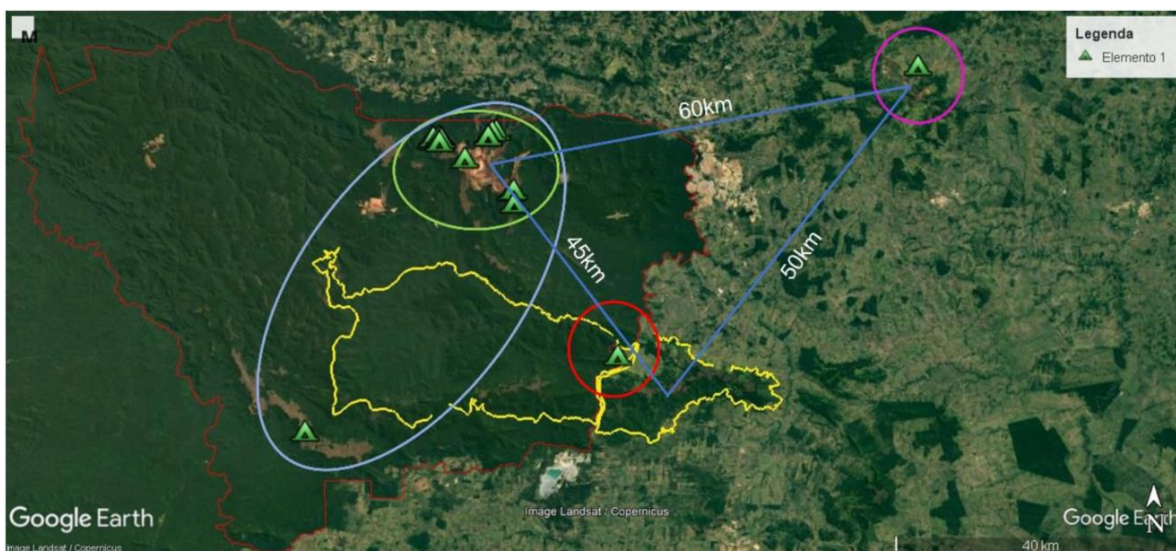
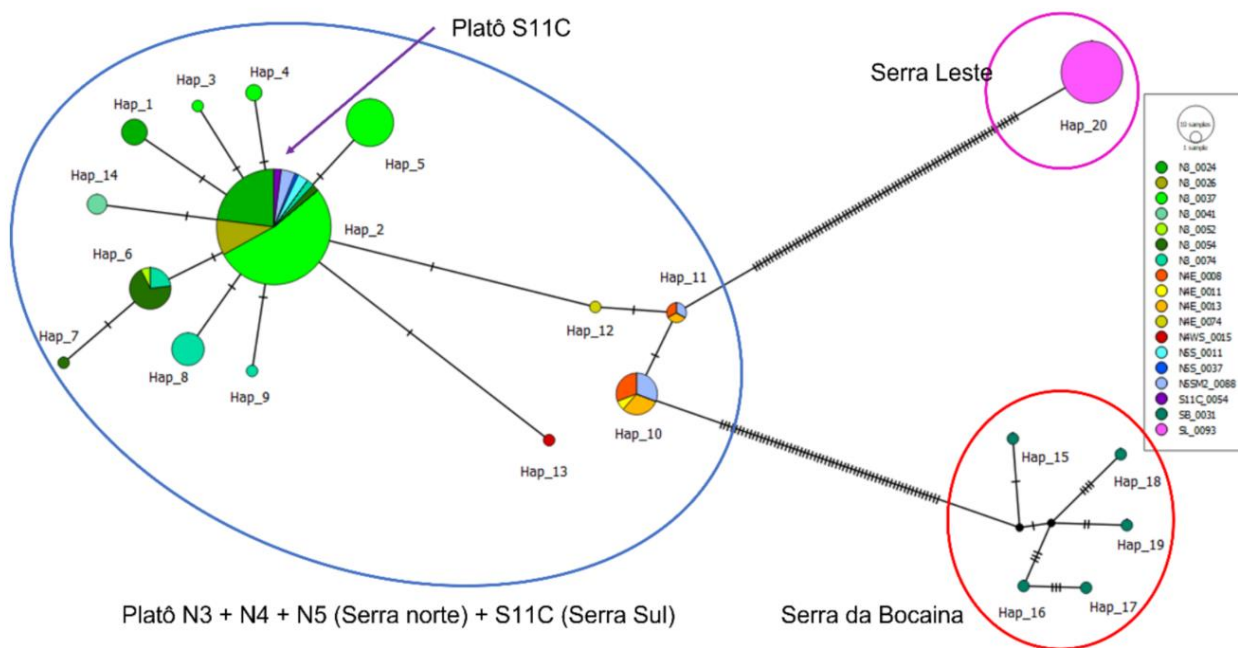


Figura 62: Rede de haplótipos amostrados em populações de *Pseudoporatia* sp. na formação ferrífera de Carajás (acima) e imagem de satélite mostrando a localização das cavernas onde os indivíduos foram coletados (abaixo).

- Anteriormente à realização deste estudo, os dados morfológicos e taxonômicos analisados durante do licenciamento ambiental na região indicavam a ocorrência de apenas um único morfótipo de Pyrgodesmidae com

ampla distribuição nas cavernas da área de estudo. A partir dos dados moleculares, foi possível observar uma estruturação molecular entre as populações amostradas nas diferentes serras, o que pode indicar a existência de até três espécies (uma para a Serra Norte, uma para a Serra da Bocaina e outra para a Serra Leste) além de uma forte associação de *Pseudoporatia* sp. com as cavernas da formação ferrífera.

- Análises prévias, realizadas a partir de dados não publicados e disponibilizados pelo Instituto Tecnológico Vale (ITV) de outras duas espécies troglóbias com ampla ocorrência na região de Carajás, indicam estruturação genética semelhante à aqui encontrada para *Pseudoporatia* sp. Tais análises foram realizadas com sequências de *cox1* obtidas de indivíduos do Diplopoda *Glomeridesmus spelaeus* e do amblipígeo *Charinus ferreus*, e em ambos os casos há indícios de diversidade críptica e espécies diferentes de acordo com a distribuição das cavernas em diferentes serras. Padrões filogeográficos semelhantes entre espécies não relacionadas, em uma mesma região, são fortes indicativos de uma história evolutiva compartilhada e moldada a partir do papel das barreiras geográficas ali presentes.

### 3.8.5 Considerações finais

Os resultados encontrados neste estudo indicam o trânsito de espécies da fauna total de artrópodes presentes no MSS, sendo também registrada a presença de espécies troglomórficas e o registros de novas espécies. Esse é um importante indicativo de continuidade do habitat subterrâneo e possível conectividade biológica entre diferentes cavernas em um mesmo platô ferruginoso. É recomendada, portanto, a utilização de metodologias semelhantes para o inventário de fauna subterrânea e possíveis monitoramentos biológicos em processos de licenciamento ambiental de empreendimentos e atividades potencialmente impactantes ao patrimônio espeleológico.

As análises filogenéticas e filogeográficas indicaram diversidade críptica em *Pseudoporatia* sp., com a possível existência de até três espécies nas diferentes serras que compõem a região de Carajás. Como todos os indivíduos analisados foram identificados, por especialistas, como um único morfotipo, a

identificação tradicionalmente realizada somente a partir de dados morfológicos não foi capaz de apontar a real diversidade existente no grupo. As análises prévias realizadas para outras espécies (*Glomeridesmus spelaeus* e *Charinus ferreus*) indicam preliminarmente um padrão semelhante, o que pode significar que a diversidade críptica é a regra para espécies troglóbias com distribuição ampla na região de Carajás/PA.

Assim, os dados aqui apresentados corroboram a hipótese de que há continuidade de habitat e conectividade biológica subterrânea, e que espécies troglóbias eventualmente migram pelo ambiente subterrâneo via MSS (ou este pode ser até mesmo o principal habitat para algumas espécies) dentro de uma mesma serra ou platôs contínuos na Formação Ferrífera de Carajás.

Ações de conservação da fauna subterrânea devem evitar focar apenas em cavernas, mas também procurar avaliar os habitats subterrâneos como um todo, incluindo as áreas de MSS circundantes. Reforça-se que as espécies troglóbias são restritas ao ambiente subterrâneo, mas não se restringem às cavernas. De maneira semelhante, diversas espécies troglóbias amplamente distribuídas e atualmente consideradas uma única entidade taxonômica podem consistir em complexos de espécies. É fundamental que as estratégias de conservação e o licenciamento ambiental de empreendimentos e atividades potencialmente impactantes ao patrimônio espeleológico sejam aprimorados e passem a considerar tais aspectos, sob pena de subestimar a diversidade local e, até mesmo, levar à extinção de possíveis espécies crípticas ou linhagens geneticamente isoladas.

#### 4. DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO

Foram encontradas diversas dificuldades durante a execução do projeto, que serão abordadas de maneira resumida a seguir

As espécies alvo do projeto são de diversos grupos taxonômicos de invertebrados, e muitas não estão nem sequer descritas até o momento. Muitas, inclusive, podem ser considerados relictos filogenéticos e filogeográficos, não possuindo espécies filogeneticamente próximas que já tenham sequências de marcadores genéticos depositadas em bancos públicos. Assim, os sequenciamentos gerados no presente projeto foram os primeiros para esses grupos, e é comum que os primers existentes (muitas vezes desenhados para diversos grupos ou, na melhor das hipóteses, para grupos próximos) não funcionem perfeitamente (ou simplesmente não funcionem).

Assim, houve dificuldades para gerar as primeiras sequências, mesmo as mitocondriais, que se repetiram (e geralmente foram mais desafiantes) nas tentativas de sequenciamentos de marcadores nucleares. Essas dificuldades ocorreram, de maneira geral, para todas as espécies alvo, mas foram geralmente contornadas. Para as planárias (Tricladida) e os Collembola, no entanto, não foi possível gerar sequências em quantidade e qualidade suficientes para a realização das análises, e por isso os trabalhos resultantes foram baseados apenas em dados morfológicos.

Ainda em relação aos dados moleculares, os sequenciamentos genômicos também foram desafiadores. Foram geradas bibliotecas de um grande número de indivíduos de todas as espécies alvo de troglóbios da Formação Jandaíra e de alguns da Formação Carajás, e ainda estão sendo gerados dados genômicos de *Endecous potiguar*. No entanto, o tipo de sequenciamento genômico realizado à época pelo ITV (denominado Genome Skimming) é mais adequado para geração de genomas mitocondriais e gera proporcionalmente menos sequências de DNA nuclear. Todos os dados já gerados são disponibilizados em material anexo a este relatório.

Apesar de suficientes para a geração de mitogenomas (alguns foram gerados, e estão disponibilizados no material anexo ao relatório – Figura 63), os dados gerados a partir de Genome Skimming não são adequados para análises populacionais e genéticas aprofundadas, que necessitam de muitos dados nucleares. Assim, uma das últimas ações do projeto foi um remanejamento de recursos para viabilizar a contratação de uma empresa especializada e o sequenciamento genômico por uma técnica mais adequada à realização de análises genômicas populacionais que dependem de dados nucleares – o GBS (Genotyping by sequencing). Essa ação foi realizada em conjunto com outro projeto apoiado com recursos de compensação espeleológica e que compartilha algumas espécies alvo, permitindo a geração de grande quantidade de dados genômicos, por dois métodos distintos, de todas as espécies alvo de troglóbios da Formação Jandaíra. São centenas de gigabytes de dados (disponibilizados em material anexo a este relatório), que possibilitarão inúmeras análises e publicações de alto impacto por muitos anos.

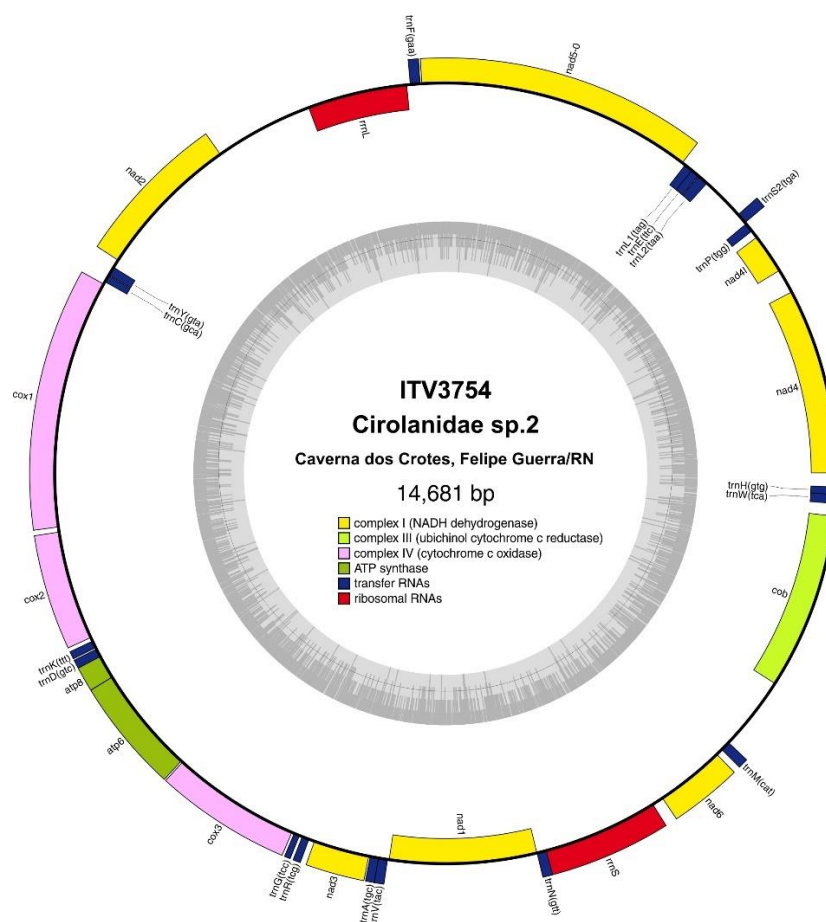


Figura 63: Representação gráfica de genoma mitocondrial de espécie alvo do projeto.

Houve dificuldades também para a realização dos trabalhos envolvendo cronobiologia. Como já foi relatado no item 3.7, um dos produtos inovadores deste projeto foi o desenvolvimento de um software específico, em código aberto. Isso, por si só, já explicaria boa parte das dificuldades relacionadas ao desenvolvimento, testes e finalização do programa. Além disso, houve problemas relacionados ao transporte dos espécimes desde os locais de coleta até o CEBS/UFLA, em Lavras/MG (onde a estrutura para realização dos experimentos está montada) e à adaptação ao cativeiro até o início dos experimentos. Mesmo com todo os cuidados necessários, diversos indivíduos não sobreviveram e isso levou a mudanças, entre outras coisas, nas espécies utilizadas. Originalmente, as análises cronobiológicas seriam realizadas com o grilo *Endecous potiguar* e o Schizomida *Rowlandius potiguar*, mas foram realizadas (entre outras espécies) com o amblipígeo *Charinus potiguar*.

Em relação aos estudos na Formação Carajás, como já foi mencionado no item 3.8, foi desenvolvida uma abordagem inovadora envolvendo amostragem biológica com armadilhas em furos de sondagem. A adaptação à metodologia inicialmente aplicada na Austrália e a confecção das armadilhas foi um processo bastante demorado. Além disso, durante a execução das amostragens, algumas armadilhas ficaram presas nos furos de sondagem e foram perdidas. Isso, no entanto, não impediu a realização do estudo, conforme informado no item 3.8.

Ainda sobre a Formação Carajás, a coleta de indivíduos das espécies alvo e a geração de sequências de DNA em quantidade e qualidade suficientes para as análises também foi desafiadora. Como apresentado no item 3.8, a única espécie para a qual foi possível, neste projeto, realizar as análises filogenéticas e filogeográficas necessários, foi o diplópode *Pseudoporatia* sp. Apesar disso, foram gerados sequenciamentos genômicos, ainda não analisados, que estão disponíveis nos anexos a este relatório.

Assim, apesar das diversas dificuldades encontradas durante a execução do projeto, elas foram adequadamente contornadas e não houve prejuízo para o alcance dos objetivos propostos inicialmente - como será demonstrado a seguir.

## 5. DISCUSSÃO ACERCA DOS RESULTADOS DO PROJETO

Os principais resultados alcançados com a execução do projeto foram tratados de forma detalhada no item 3. No entanto, teceremos aqui alguns comentários e comparação entre os resultados efetivamente obtidos e os produtos originalmente planejados.

### **a. Compreensão apurada da constituição biótica cavernícola da Formação Jandaíra**

Os estudos realizados durante o projeto envolveram espécies troglóbias aquáticas dos grupos Isopoda (Cirolanidae), Amphipoda (Mesogammaridae), Tricladida (*Hausera* sp.) e terrestres (Hemiptera: Kinnaridae: *Kinnapotiguara troglobia*). Entre outros aspectos, que serão discutidos nos próximos itens, foram identificadas diversas linhagens crípticas que podem consistir em até 18 novas espécies endêmicas da região. Isso representaria um acréscimo de mais de 30% sobre as 57 espécies troglóbias atualmente conhecidas para a área (Bento et al., 2021).

O projeto abordou também as espécies troglófilas *Endecous potiguar* (Orthoptera: Phalangopsidae), *Rowlandius potiguar* (Schizomida: Hubbardiidae), *Charinus potiguar* (Amblypygi: Charinidae) e colêmbolos do gênero *Trogolaphysa* (Entomobryomorpha: Paronellidae), abordando aspectos morfológicos, genéticos, bioacústicos e cronobiológicos. Assim como nos grupos troglóbios, foi identificada diversidade críptica que pode levar à descrição de até três novas espécies.

Esses estudos também geraram subsídios para uma avaliação mais robusta do status ecológico-evolutivo dessas espécies, se troglóbias ou troglófilas. Assim, em relação aos grupos alvo do projeto, entende-se que o objetivo de fornecer uma compreensão apurada da constituição biótica cavernícola da Formação Jandaíra foi plenamente alcançado.

## **b. Compreensão da diversidade dos táxons estudados e de sua história evolutiva.**

Como mencionado no item anterior, o projeto possibilitou uma compreensão ampla da diversidade (incluindo a diversidade críptica) dos táxons estudados e de sua história evolutiva.

No caso das espécies troglóbias da Formação Jandaíra, as reconstruções filogenéticas bayesianas com relógio molecular reforçaram a condição de relictos oceânicos dos isópodes cirolanídeos e dos anfípodes do gênero *Potiberaba*, ao apontar a divergência mais antiga entre as linhagens em período compatível com o último evento de regressão oceânica regionalmente bem documentado. Essas reconstruções, aliadas às análises filogeográficas, indicaram uma diversificação moldada ainda pelas demais mudanças paleoclimáticas que marcaram a região e estão intimamente relacionadas também com a origem do próprio bioma Caatinga. Por fim, no caso das espécies troglóbias, evidenciou-se que a hidrografia (distribuição das cavernas em diferentes microbacias) e a distribuição das cavernas nos diferentes afloramentos calcários (lajedos) foram determinantes para a estruturação genética observada, respectivamente, nos táxons troglóbios aquáticos (isópodes e anfípodes) e terrestre (*K. troglobia*).

O mesmo pode ser dito das espécies troglófilas da Formação Jandaíra (*E. potiguar* e *R. potiguar*) cujo material coletado permitiu a geração de sequências de marcadores genéticos em quantidade e qualidade suficiente para a realização de análises filogenéticas e filogeográficas adequadas.

No caso dos colêmbolos (*Trogolaphysa* sp.) e das planárias (Tricladida), pelos motivos já expostos anteriormente, não foi possível realizar tais análises. No entanto, os estudos realizados, envolvendo principalmente dados morfológicos, também contribuíram para a ampliação do conhecimento sobre esses táxons e sua conservação, inclusive gerando subsídios importantes para a descrição de novas espécies.

Em relação ao táxon troglóbio estudado na Formação Carajás, *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae), os estudos realizados também

permitiram uma compreensão mais apurada sobre a diversidade genética, inclusive com a existência de diversidade críptica.

Por fim, embora não tenha sido objetivo do projeto, estão sendo gerados genomas completos de espécies cavernícolas da Formação Jandaíra em parceria com o projeto Iridium Genomes (<https://www.iridiangenomes.com/>) de algumas espécies alvo. A iniciativa tem como objetivo gerar genomas completos de todas as espécies descritas no planeta, e trabalha com diversos museus, universidades e pesquisadores em todo o mundo. Até o momento, foram disponibilizados arquivos brutos do sequenciamento (ainda não curados e anotados) no banco de dados público National Center for Biotechnology Information (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>) para as espécies troglóbias de cigarrinha *Kinnapotiguara troglobia* (número de acesso PRJNA1151955), anfípode *Potiberaba porakuara* (PRJNA1151958) e planárias *Hausera hauseri* (PRJNA1151947) e *Sluysia triapertura* (PRJNA1161665), além do Schizomida troglófilo *Rowlandius potiguar* (PRJNA1151959). Além do genoma completo, por si só, ser um produto importantíssimo, quando devidamente curados e anotados servirão de base para diversos estudos genéticos posteriores.

**c. Determinação de padrões de distribuição de populações e espécies de invertebrados troglóbios aquáticos (Amphipoda, Cirolanidae (Isopoda) e Tricladida) e terrestres (Kinnaridae (Hemiptera: Fulgoromorpha), Collembola, Circoniscidae e Caponiidae), além de espécies atualmente consideradas troglófilas (*Rowlandius potiguar* e *Endecous potiguar*).**

Conforme observado nos resultados dos diversos subprojetos apresentados no item 3, foram determinados padrões filogenéticos e filogeográficos (o que inclui a delimitação das diferentes populações) para as espécies troglóbias aquáticas dos grupos Isopoda (Cirolanidae) e Amphipoda (Mesogammaridae) e terrestre (Hemiptera: Kinnaridae: *Kinnapotiguara troglobia*), além de espécies troglófilas (*E. potiguar* e *R. potiguar*) da Formação Jandaíra. O mesmo pode ser dito do táxon troglóbio estudado na Formação Carajás, *Pseudoporatia* sp. (Diplopoda: Pyrgodesmidae).

No entanto, isso não foi possível para os táxons de planárias (Tricladida) e colêmbolos (Collembola), na Formação Jandaíra, e para os isópodes das famílias Circoniscidae e para as aranhas da família Caponiidae, na Formação Carajás. Como exposto anteriormente, não foi possível gerar sequências de DNA em quantidade e qualidade suficiente para as análises. Como mencionado anteriormente, entende-se que isso não prejudicou o alcance dos objetivos do projeto pois foram geradas informações, de outras fontes, para os referidos táxons ou outros que levaram a resultados igualmente satisfatórios e aplicáveis à conservação.

**d. Proposição de modelos de evolução biológica para os táxons alvo, a partir de dados de distribuição, fluxo gênico e tempo de divergência entre as linhagens.**

Como demonstrado nos resultados dos diversos subprojetos apresentados no item 3, foram obtidos e utilizados dados de distribuição geográfica e sequências de marcadores genéticos na realização de análises filogenéticas e filogeográficas que resultaram em informações de fluxo gênico e tempo de divergência para a maioria dos táxons alvo do projeto. Os resultados dessas análises, junto com informações relacionadas principalmente à paisagem atual (distribuição das cavernas em relação à hidrografia e afloramentos rochosos, calcários e ferruginosos) e à evolução geológica e paleoclimática, permitiram inferir a evolução biológica dos táxons alvo.

Os motivos pelos quais não foi possível realizar tais análises para todos os táxons inicialmente propostos foram expostos anteriormente.

**e. Proposição de modelos de conectividade em ambientes subterrâneos aquáticos e terrestres na Formação Jandaíra, e terrestre na Formação Carajás, baseados na dispersão da fauna cavernícola.**

Os resultados obtidos com os diferentes subprojetos indicam que a hidrografia atual é um fator determinante para a estruturação genética dos troglóbios aquáticos na Formação Jandaíra. No entanto, a existência de fluxo

gênico entre diferentes localidades (cavernas ou nascentes cársticas) parece ser bem mais restrita, e as análises indicam que isso pode ocorrer apenas entre localidades geograficamente próximas (desde que em uma mesma microbacia hidrográfica).

No caso do meio subterrâneo terrestre da Formação Jandaíra, a distribuição das cavernas nos diferentes lajedos foi o fator determinante para a estruturação genética encontrada em *Kinnapotiguara troglobia*. Mas, assim como no ambiente aquático, a ocorrência de fluxo gênico parece ser ainda mais restrita e somente alguns lajedos abrigam uma única população. Foi o caso do lajedado do Rosário, em Felipe Guerra/RN, que pode ser considerado um hotspot de biodiversidade subterrâneo justamente por provavelmente abrigar dezenas de cavernas interconectadas e que devem constituir um sistema biológico subterrâneo único.

No caso da Formação Carajás, as análises realizadas com *Pseudoporatia* sp. também fornecem indícios de que os platôs ferruginosos são formações geológicas análogas aos lajedos da Formação Jandaíra (e possivelmente em outras formações calcárias). Ao agruparem várias cavernas geograficamente próximas e possivelmente conectadas por espaços subterrâneos de menores dimensões, tais formações provavelmente permitem o trânsito de diversas espécies troglóbias, e a estruturação genética observada em *K. troglobia* e *Pseudoporatia* sp. pode ser esperada para outras espécies troglóbias.

#### **f. Proposição de ações voltadas à conservação e gestão do patrimônio espeleológico das áreas alvo.**

Por fim, e conforme apresentado nos resultados dos subprojetos no item 3, foram propostas diversas ações voltadas à conservação e gestão do patrimônio espeleológico nas áreas alvo do projeto. Essas proposições envolvem a identificação de áreas prioritárias para a conservação, sugestões de categorização do risco de extinção das espécies nominiais e das linhagens crípticas identificadas, manejo das áreas e cavernas onde as espécies ocorrem (incluindo a geração de subsídios para a elaboração de planos de manejo espeleológicos em cavernas com proposta de uso turístico no Parque Nacional

da Furna Feia/RN e no município de Felipe Guerra/RN), sugestões de aprimoramento da legislação e do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos e atividades potencialmente impactantes ao patrimônio espeleológico, etc. A identificação e geração de subsídios para a descrição de novas espécies, por si só, pode ser considerada uma ação de conservação pois somente espécies descritas podem passar pelo processo oficial de avaliação do risco de extinção e serem incluídas em listas oficiais da fauna ameaçada e incluídas em Planos de Ação Nacionais (PAN), por exemplo.

Assim, considera-se que os objetivos e resultados inicialmente propostos foram amplamente alcançados, ampliando o conhecimento sobre o patrimônio espeleológico e as espécies cavernícolas e gerando conhecimento aplicável à sua conservação. Por fim, a execução do projeto resultou em diversos avanços na implementação do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (PNCPE), como será discutido no item a seguir.

## 6. PRINCIPAIS AVANÇOS NA IMPLEMENTAÇÃO DO PNCPE

O Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (PNCPE) foi instituído pela Portaria nº 358, de 30 de setembro de 2009, do Ministério do Meio Ambiente, e tem como objetivo desenvolver estratégia nacional de conservação e uso sustentável do patrimônio espeleológico brasileiro.

O PNCPE possui seis componentes, a saber:

- **Componente 1** - Conhecimento do Patrimônio Espeleológico: visa o apoio à geração, sistematização e disponibilização de informações sobre o Patrimônio Espeleológico do país, apoiando a gestão com metas relacionadas à produção de inventários, à realização de pesquisas, tendo as seguintes metas iniciais:

1. Inventário Anual do Patrimônio Espeleológico Nacional;
2. Diagnóstico das Unidades Espeleológicas do Brasil; e
3. Programa de pesquisa aplicado à conservação e manejo de cavernas.

- **Componente 2** - Conservação do Patrimônio Espeleológico: visa a conservação in situ dos ecossistemas, incluindo os serviços ambientais, bem como definição de ações para implementação de instrumentos econômicos para a conservação do Patrimônio Espeleológico, tendo as seguintes metas iniciais:

1. Criação 30 Unidades de Conservação Federais com o objetivo de proteger cavidades naturais subterrâneas de significativa importância ecológica e cênica;

2. Realização de estudos espeleológicos na elaboração de Planos de Manejo nas Unidades de Conservação federais.

- **Componente 3** - Utilização Sustentável dos Componentes do Patrimônio Espeleológico: prioriza metas de uso sustentável do Patrimônio Espeleológico, incluindo o ordenamento do espeloturismo e o apoio a práticas e negócios sustentáveis que garantam a manutenção da geodiversidade e da funcionalidade do patrimônio espeleológico, tendo como meta inicial a elaboração de um programa de turismo sustentável para as cavernas brasileiras, incentivando a inserção do Brasil no cenário mundial da prática de espeleomergulho, com abertura do circuito nacional;

- **Componente 4** - Monitoramento, Avaliação, Prevenção e Mitigação de Impactos sobre o Patrimônio Espeleológico: visa estabelecer e fortalecer sistemas de monitoramento, de avaliação, de prevenção e de mitigação de impactos sobre o Patrimônio Espeleológico, apoiando inclusive processos de recomposição e recuperação dos ecossistemas degradados e dos componentes da geodiversidade, tendo como meta inicial a elaboração de norma para regulamentação do uso do patrimônio espeleológico com base no diagnóstico espeleológico brasileiro e em consonância com os princípios estabelecidos neste Programa;

- **Componente 5** - Divulgação sobre o Patrimônio Espeleológico: objetiva comunicar para os setores interessados informações sobre o Patrimônio Espeleológico, com a participação da sociedade, comunidade científica, povos indígenas, quilombolas e outras comunidades locais, no respeito à conservação do Patrimônio Espeleológico, tendo as seguintes metas iniciais:

1. Lançamento da Revista Brasileira de Espeleologia; e
2. Criação e implementação do Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas-CANIE.

- **Componente 6** - Fortalecimento Institucional para a Gestão do Patrimônio Espeleológico: objetiva o fortalecimento da infraestrutura, formação e fixação de recursos humanos, criação de mecanismos de financiamento e fortalecimento do marco-legal, tendo como meta inicial a realização do primeiro curso de pós-graduação lato sensu em espeleologia do Brasil.

Uma das principais estratégias para auxiliar a execução do PNCPE é o apoio a ações e projetos que atendam a um ou mais de seus componentes por meio do direcionamento de recursos de compensação espeleológica. A Instrução Normativa ICMBio nº 01/2017, que regulamenta as chamadas “outras formas de compensação espeleológica” que resultam nos Termos de Compromisso de Compensação Espeleológica (TCCEs) afirma, em seu art. 3º, inciso II, que as outras formas de compensação compreenderão a implementação de ações do PNCPE. Assim, os projetos apoiados com recursos de TCCEs devem entregar resultados que, de fato, contribuam para isso.

Nesse contexto, discutimos abaixo como a execução do projeto contribuiu para a implementação de cada um dos componentes do PNCPE.

### **Componente 1 do PNCPE**

O componente 1 do PNCPE visa à geração, sistematização e disponibilização de informações sobre o Patrimônio Espeleológico do país, incluindo a realização de pesquisas. Com a execução deste projeto, foram realizados oito subprojetos que resultaram, até o momento, na publicação de três teses de doutorado, cinco dissertações de mestrado, cinco artigos científicos (quatro deles em revistas internacionais nível Qualis/CAPES A), oito resumos em anais de congressos (dois deles premiados), uma cartilha e um software.

Esses produtos, por si só, são suficientes para atestar o atendimento a esse componente, mas também têm implicações nos outros componentes – como será abordado a seguir.

## **Componente 2 do PNCPE**

O componente 2 do PNCPE objetiva a conservação *in situ* dos ecossistemas, incluindo os serviços ambientais, bem como definição de ações para implementação de instrumentos econômicos para a conservação do Patrimônio Espeleológico. Além de ações voltadas à criação de unidades de conservação (UC) com foco na proteção de cavernas, esse componente também visa apoiar a gestão das UCs já instituídas.

As duas linhas foram atendidas pelo projeto. Um dos resultados do subprojeto apresentado no item 3.1 foi a identificação de áreas prioritárias para a conservação da diversidade genética de alguns táxons alvo do projeto, gerando subsídios para a delimitação de uma UC na região dos municípios de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado, a maior concentração de cavernas no estado do Rio Grande do Norte (RN).

Além disso, o projeto envolveu quatro UCs – a Floresta Nacional de Carajás e o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no Pará, e o Parque Nacional da Furna Feia/RN e o recém criado Monumento Natural Estadual Cavernas de Martins, no RN. As informações geradas pelo projeto certamente poderão ser utilizadas na elaboração ou atualização dos planos de manejo dessas unidades. Pelo menos uma dessas UCs, o PARNA da Furna Feia, de fato já utilizou informações gerados no projeto para a elaboração do plano de manejo e zoneamento da UC (para mais informações, visitar <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/caatinga/lista-de-ucs/parna-da-furna-feia>).

## **Componente 3 do PNCPE**

O componente 3 do PNCPE prioriza metas de uso sustentável do Patrimônio Espeleológico, incluindo o ordenamento do espeloturismo. Como mencionado anteriormente, embora não fosse especificamente um dos objetivos do projeto, as informações geradas subsidiaram a elaboração de, até o momento, planos de manejo espeleológico para as cavernas Furna Nova, no

Parque Nacional da Furna Feia/RN, e caverna dos Crotes, em Felipe Guerra/RN (Figura 64).

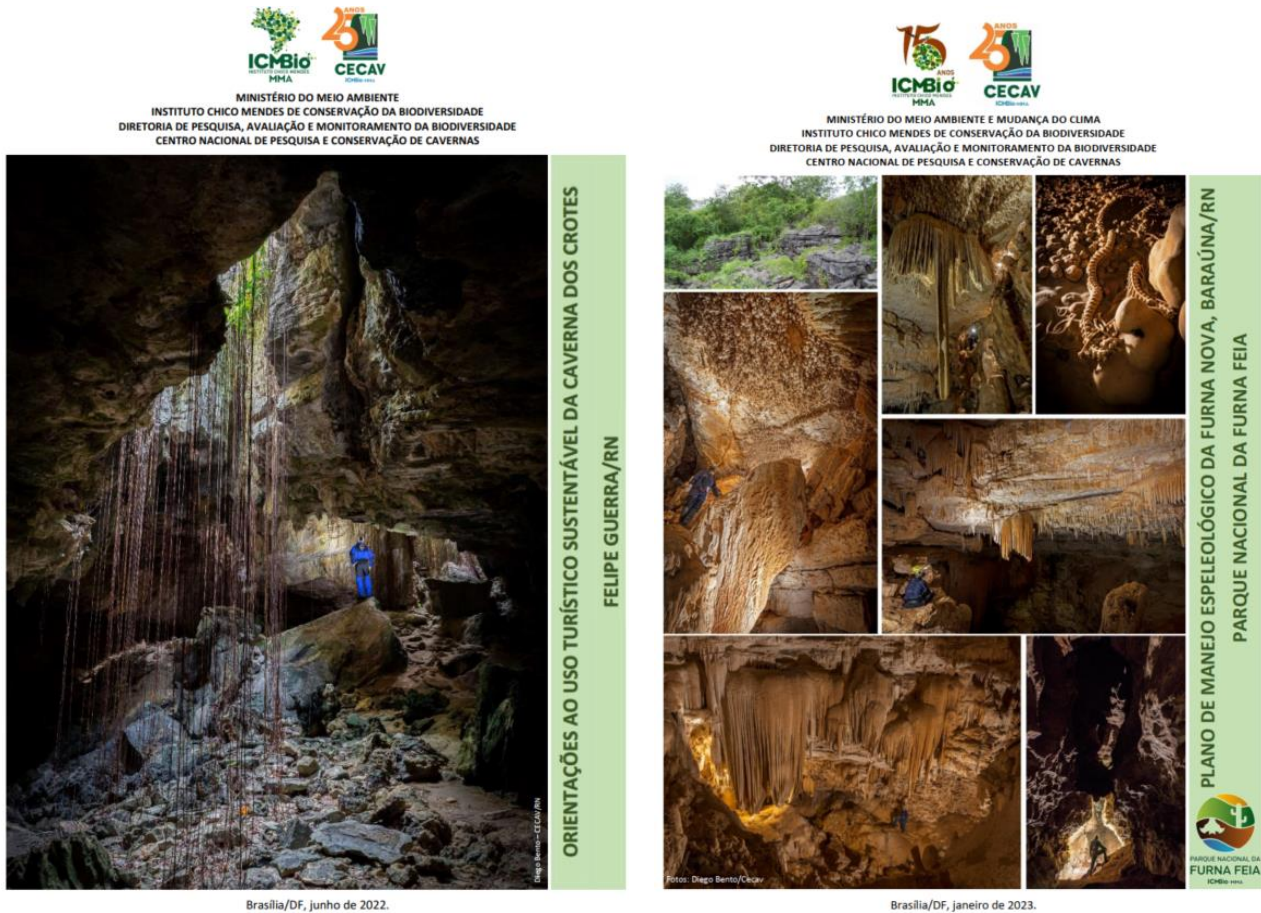


Figura 64: Capas dos planos de manejo espeleológicos da caverna dos Crotes, em Felipe Guerra/RN, e da Furna Nova, no Parque Nacional da Furna Feia/RN.

#### **Componente 4 do PNCPE**

O componente 4 do PNCPE visa estabelecer e fortalecer sistemas de monitoramento, de avaliação, de prevenção e de mitigação de impactos sobre o Patrimônio Espeleológico. No que tange à avaliação e prevenção de impactos ao PE, uma das principais ações é a avaliação oficial do risco de extinção das espécies. No caso da fauna, o ICMBio é o responsável por conduzir a etapa técnica da avaliação e subsidiar o Ministério do Meio Ambiente e da Mudança do Clima para a elaboração e publicação periódicas de portaria com a lista oficial das espécies ameaçadas de extinção. Esse processo direciona várias ações de conservação, como a criação de UCs e a elaboração de Planos de Ação Nacionais (PANs).

Nesse sentido, o presente projeto resultou na geração de subsídios para a avaliação do risco de extinção de várias das espécies (e linhagens crípticas) alvo, particularmente espécies troglóbias da Formação Jandaíra.

### ***Componente 5 do PNCPE***

O componente 5 do PNCPE é focado na divulgação, objetivando comunicar para os setores interessados informações sobre o Patrimônio Espeleológico, com a participação da sociedade, comunidade científica, povos indígenas, quilombolas e outras comunidades locais.

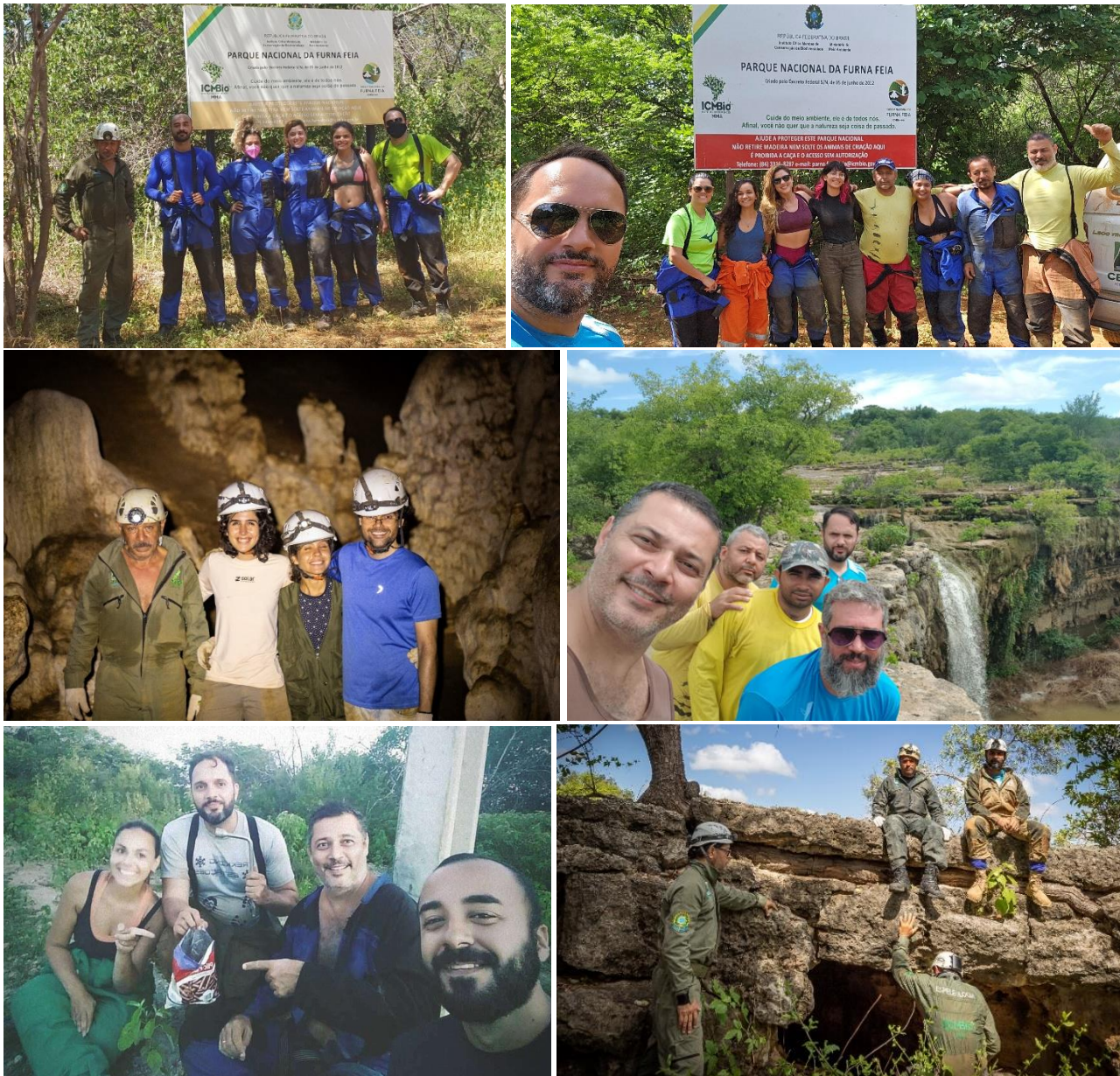
Como mencionado para o componente 1, o projeto resultou, até o momento, na publicação de três teses de doutorado, cinco dissertações de mestrado, cinco artigos científicos, oito resumos em anais de congressos, uma cartilha e um software. Além de atingir a comunidade científica com as referidas publicações, a cartilha resultante do projeto apresentado no item 3.1 foi utilizada em um processo de capacitação de professores da rede pública nos municípios de Felipe Guerra e Baraúna, no RN, sendo também utilizada em atividades de extensão da UFERSA e distribuída a milhares de alunos.

### ***Componente 6 do PNCPE***

O componente 6 do PNCPE visa o fortalecimento institucional para a gestão do patrimônio espeleológico, objetivando o fortalecimento da infraestrutura, formação e fixação de recursos humanos. Além da aquisição de diversos equipamentos que fortaleceram a infraestrutura das instituições executora e parceiras, a execução do projeto resultou, principalmente, numa forte ampliação na formação de recursos humanos.

Foram formados três doutores com a execução do projeto, dois deles analistas ambientais do ICMBio/Cecav. Isso certamente contribuirá para a uma melhor execução de suas atribuições e com o cumprimento da missão institucional do ICMBio/Cecav. Além disso, houve uma ampliação muito significativa na quantidade de pesquisadores com formação na área de bioespeleologia na Formação Jandaíra. Antes do início do projeto, havia apenas dois mestres e um biólogo graduado, e atualmente são três doutores, cinco

mestres e um graduado, além de dois estudantes de iniciação científica que atuaram indiretamente nos subprojetos. É importante frisar que três dos cinco mestres formados durante o projeto estão atualmente cursando doutorados, todos aprofundando as pesquisas iniciadas neste projeto, o que indica que as ações têm tido continuidade.



Fica aqui registrada a torcida para que esses jovens pesquisadores continuem fascinados pelas cavernas e sua biodiversidade única, ampliando o conhecimento sobre o patrimônio espeleológico e lutando por sua conservação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash L, Shindey R, Sharma VK (2017) To be or not to be rhythmic? A review of studies on organisms inhabiting constant environments. *Biological Rhythm Research* 48 (5): 677-691. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1345426>
- Abrantes EA, Bellini BC, Bernardo AN, Fernandes LH, Mendonca MC, Oliveira EP, & Zeppelini D (2010) Synthesis of Brazilian Collembola: an update to the species list. *Zootaxa* 2388(1): 1-22. DOI: 10.11646/zootaxa.2388.1.1
- Abrantes EA, Bellini BC, Bernardo AN, Fernandes LH, Mendonça M., Oliveira E., ... & Zeppelini D (2012) Errata Corrigenda and update for the "Synthesis of Brazilian Collembola: An update to the species list." ABRANTES et al. (2010). *Zootaxa*, 2388: 1-22. *Zootaxa* 3168(1): 1-21. DOI: [10.11646/zootaxa.3168.1.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.3168.1.1)
- ADIS J (Ed.) (2002) Amazonian Arachnida and Myriapoda. Identification Keys to All Classes, Orders, Families, Some Genera, and Lists of Known Terrestrial Species. Pensoft Publishers, Sofia–Moscow
- Alexander RD (1957) The taxonomy of the field crickets of the eastern United States (Orthoptera: Gryllidae: *Acheta*). *Annals of the Entomological Society of America* 50(6): 584-602. <https://doi.org/10.1093/aesa/50.6.584>
- Álvarez-presas M, Riutort M (2014) Planarian (Platyhelminthes, Tricladida) diversity and molecular markers: a new view of an old group. *Diversity* 6 (2): 323-338. <https://doi.org/10.3390/d6020323>
- Andrade R, Saback L (2015) Levantamento da fauna troglomórfica em meso e micro cavidades no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. In: I Simpósio Brasileiro de Biologia Subterrânea, 2015, Lavras. SBBS – Resumos. Lavras, v. 1.
- Arlé R (1939) Collemboles nouveaux de Rio de Janeiro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 11: 25-32.
- Arlé R, Guimarães AE (1979) Nova espécie do gênero *Paronella* Schött, 1893 do Rio de Janeiro (Collembola). *Revista Brasileira de Entomologia* 23: 213–217.
- Armas LD (2002) Nuevas especies de *Rowlandius* Reddell & Cokendolpher, 1995 (Schizomida: Hubbardiidae) de Cuba. *Revista Ibérica de Aracnología* 6: 149-167.
- Armas LD et al. (2009) Nuevo *Rowlandius* Reddell & Cokendolpher, 1995 (Schizomida: Hubbardiidae) de la Sierra San Luis, Venezuela noroccidental. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49: 361-368. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492009002800001>
- Ázara LN, Ferreira RL (2014) Two new troglobitic Newportia (Newportia) from Brazil (Chilopoda: Scolopendromorpha). *Zootaxa* 3881 (3): 267–278. DOI: 10.11646/zootaxa.3881.3.5

Barr T (1967) Observations on the ecology of caves. *The American Naturalist* 101: 475–491.

Beale AD, Whitmore D, Moran D (2016) Life in a dark biosphere: a review of circadian physiology in “arrhythmic” environments. *Journal of Comparative Physiology B* 186: 947-968. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1000-6>

Bellini BC, Fernandes LH, Zeppelini D (2010) Two new species of *Seira* (Collembola, Entomobryidae) from Brazilian coast. *Zootaxa* 2448(1): 53-60. DOI: 10.11646/zootaxa.2448.1.4

Bellini BC & Cipola NG (2017) The Neotropical genera of Paronellinae (Collembola, Entomobryoidea, Paronellidae) with description of two new species and redescription of *Campylothorax mitrai*. *Zootaxa* 4300, 151. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4300.2.1>

Bellinger PF, Christiansen KA, Janssens F (1996–2017) Checklist of the Collembola of the World. Disponível em [http:// www.collembola.org](http://www.collembola.org) (acessado em 10 Mai 2017).

Benítez-Álvarez L, Leal-Zanchet AM, Ocegüera-Figueiroa A, et al. (2020) Phylogeny and biogeography of the Cavernicola (Platyhelminthes: Tricladida): Relicts of an epigeal group sheltering in caves? *Molecular phylogenetics and Evolution* 145: 106709

Bento DM (2011) Diversidade de invertebrados em cavernas calcárias do Oeste potiguar: subsídios para a determinação de áreas prioritárias para conservação. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 160 p.

Bento DM (2021) Filogeografia de artrópodes troglóbios do oeste da Formação Jandaira, Nordeste do Brasil: Evolução e conectividade biológica em ambientes subterrâneos como base para ações de conservação. 162 f. Tese. (Doutorado em Sistemática e Evolução) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Bento DM, Cruz JB, Freitas JIM, Campos UP (2015) Área de proteção ambiental Pedra de Abelha: proposta para a conservação da maior concentração de cavernas do Rio Grande do Norte. *Anais do 33.º Congresso Brasileiro de Espeleologia*, SBE. Eldorado-SP.

Bento DM, Ferreira RL, Prous X, Souza-Silva M, Bellini BC, Vasconcellos A (2016) Seasonal variations in cave invertebrate communities in the semiarid Caatinga, Brazil. *Journal of Cave and Karst Studies* 78(2):61–71. DOI: 10.4311/2015LSC0111

Bento DM, Souza-Silva M, Vasconcellos A, Bellini BC, Prous X, Ferreira RL (2021) Subterranean oasis in the Brazilian semiarid region: neglected sources of biodiversity. *Biodivers Conserv.* <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>

Bento DM, Ferreira RL, Vasconcelos S, Lima JLR, Oliveira G, Silva TC, Lima AMQ (2024) Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid. *Biodiversity and Conservation* 33:1985-2010. <https://doi.org/10.1007/s10531-024-02833-w>

Bianchi FM & Gonçalves LT (2021) Borrowing the Pentatomomorpha tome from the DNA barcode library: Scanning the overall performance of *cox1* as a tool. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59(5): 992-1012

Bichuette ME, Fonseca-Ferreira R, Gallão JE (2015) Biota subterrânea associada às cavernas em formação ferrífera. 174-191 p. In: Ruchkys U. A. Travassos, L. E. P. Rasteriro, M. A. Faria, L. E. (Eds.) *Patrimônio Espeleológico em Rochas Ferruginosas: propostas para sua conservação no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais*. Campinas/SP, Sociedade Brasileira de Espeleologia, 354 p.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22:148–155

Börner C (1903) Über neue Altweltliche Collembolen, nebst Bemerkungen zur Systematik der Isotominen und Entomobryinen. *Gesellschaft naturforschender Freunde*, 129–182

Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A et al (2019) BEAST 2.5: an advanced software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>

Brady J (1981) *Behavioral Rhythms in Invertebrates*. Em: Aschoff, J., editor. *Biological Rhythms*. Springer, Boston, MA

CANIE/CECAV (2020) *Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas*. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>. Acesso em 30 dez. 2020

Carmo FF (2010) *Importância ambiental e estado de conservação dos ecossistemas de cangas no Quadrilátero Ferrífero e proposta de Áreas-Alvo para a Investigação e Proteção da Biodiversidade em Minas Gerais*. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Biológicas. 90 p.

Carmo FF, Kamino LH (2015) *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais / organizado por Flávio Fonseca do Carmo e Luciana Hiromi Yoshino Kamino*. — Belo Horizonte: 3iEditora.

Carneiro MA, Bezerra FHR, SILVA CCN, Pinheiro R, Cazarin CL (2015) Controle estrutural do sistema cárstico epigenético na formação Jandaíra, bacia potiguar. *Geociências (São Paulo)*, 34(2): 199-209

CARSTE Consultores Associados (2011) Serra Leste – Espeleologia: Diagnóstico espeleológico, diagnóstico bioespeleológico e análise de relevância. Belo Horizonte, Minas Gerais. 549p.

Castro-Souza R, Junta GP, Ferreira R (2020). Description and ecology of a new species of the cricket genus *Endecous* (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae) in the speleological province of Arcos-Pains-Doresópolis, Southeastern Brazil. *Zootaxa* 4821 (2): 305–332

Chapin KJ (2015) Cave-epigeal behavioral variation of the whip spider *Phrynus longipes* (Arachnida: Amblypygi) evidenced by activity, vigilance, and aggression. *Journal of Arachnology* 43: 214–219

Chapin KJ & Hebets EA (2016) The behavioral ecology of amblypygids. *Journal of Arachnology* 44: 1-14

Christiansen K (1961) Convergence and parallelism in cave Entomobryinae. *Evolution* 15: 288–301. <https://doi.org/10.2307/2406229>

Christiansen K (1965) Behavior and form in the evolution of cave Collembola. *Evolution* 19: 529. <https://doi.org/10.2307/2406249>

Cokendolpher JC. & Reddell JR (2000) New and rare Schizomida (Arachnida: Hubbardiidae) from South America. *Amazoniana: Limnologia et Oecologia Regionalis Systematis Fluminis Amazonas* 16(1-2): 187-212

Costa NKRD (2022) Filogeografia do grilo *Endecous potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 (Orthoptera, Phalangopsidae): investigação de linhagens crípticas em cavernas na formação Jandaíra. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Costa WJ, Amorim PF, Mattos JLO (2018) Synchronic historical patterns of species diversification in seasonal aplocheiloid killifishes of the semi-arid Brazilian Caatinga. *PloS One*, 13(2), e0193021

Cruz JB, Bento DM, Bezerra FHR, Freitas JIM, Campos UP (2010) Diagnóstico Espeleológico do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Espeleologia* 1(1):1-24

Culik MP & Filho DZ (2003) Diversity and distribution of collembola (arthropoda: hexapoda) of Brazil. *Biodiversity & Conservation* 12: 1119-1143. <https://doi.org/10.1023/A:1023069912619>

Culver DC (1982) *Cave Life. Evolution and Ecology*: Cambridge, Harvard University Press.

Culver DC, Sket B (2000) Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies* 62: 11–17

Culver DC, Pipan T (2009) *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*: New York, Oxford University Press, 256 p.

- Culver DC.& Pipan T (2015) Shifting paradigms of the evolution of cave life. *Acta Carsologica* 44: 415–425. <https://doi.org/10.3986/ac.v44i3.1688>
- Culver DC, Pipan T, Schneider K (2009) Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. *Freshwater Biology* 54: 918–929
- Cunha HA & Solé CAM (2012) Análise filogeográfica. In: Matioli SR, Fernandes FMC. *Biologia molecular e evolução*. 2. ed. São Paulo: Holos Editora, p. 250-250
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772-772.
- David JADO, Zefa E, Fontanetti CS (2003) Cryptic species of *Gryllus* in the light of bioacoustic (Orthoptera: Gryllidae). *Neotropical Entomology* 32: 75-80.
- Duboué ER, Borowsky RL (2012) Altered rest-activity patterns evolve via circadian independent mechanisms in cave adapted balitorid loaches. *PLoS One* 7:e30868
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x>
- Enghoff H, Golovatch S, Short M, Stoev P, Wesener T (2015) Diplopoda - taxonomic overview 2: 363-453
- Excoffier L, Lischer HL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587
- Ferrari JA, Karmann I (2008) Comportamento hidrodinâmico de sistemas cársticos na bacia do rio Betari, Município de Iporanga-SP. *Geologia USP. Série Científica* 8 (1): 1-13
- Ferreira RL (2005) A vida subterrânea nos campos ferruginosos. *O Carste* 3: 106-115
- Ferreira RL, Prous X, Bernardi LFO, Souza-Silva M (2010) Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização E impactos. *Revista Brasileira De Espeleologia* 1:25–51
- Ferreira RL, Oliveira MPA, Souza-Silva M (2015) Biodiversidade subterrânea em geossistemas ferruginosos. IN: *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais / organizado por Flávio Fonseca do Carmo e Luciana Hiromi Yoshino Kamino*. Belo Horizonte : 3i Editora.

Ferreira RL et al (2022) Brazilian cave heritage under siege. Science. <https://doi.org/10.1126/science.abo1973>

Ferreira RL, Berbert-Born M, Souza-Silva M (2023) The Água Clara cave system in northeastern Brazil: the richest hotspot of subterranean biodiversity in South America. Diversity 15(6): 761. <https://doi.org/10.3390/d15060761>

Ficetola GF, Canedoli C, Stoch F (2019) The Racovitza impediment and the hidden biodiversity of unexplored environments. Conserv Biol. <https://doi.org/10.1111/cobi.13179>

Finston T, Johnson M, Humphreys W, Eberhard SM, Halse SA (2007) Cryptic speciation in two widespread subterranean amphipod genera reflects historical drainage patterns in an ancient landscape. Mol Ecol 16: 355–365

Fišer C, Zagmajster M, Ferreira RL (2013) Two new Amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. Systematics and Biodiversity 11 (2): 117-139

Fišer C, Robinson CT, & Malard F (2018) Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. Molecular Ecology 27(3): 613-635

Folmer M, Black W, Hoeh R, Lutz L, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3(5):294–299

Friedrich M (2013) Biological Clocks and Visual Systems in Cave-Adapted Animals at the Dawn of Speleogenomics. Integrative and Comparative Biology 53, 50–67. Checklist dataset. <https://doi.org/10.1093/icb/ict058>

Gallão JE, Ribeiro DB, Gallo JS, Bichuette ME (2023) There and Back Again - The Iगतu Hotspot Siliciclastic Caves: Expanding the data for subterranean fauna in Brazil, Chapada Diamantina Region. Diversity 15(9): 991.

Gibert J, Deharveng L (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. Bioscience 52 (6): 473 - 481

Giupponi AP et al. (2016) *Rowlandius dumitrescoae* species group: new diagnosis, key and description of new cave-dwelling species from Brazil (Schizomida, Hubbardiidae). ZooKeys 632: 13-34. doi: [10.3897/zookeys.632.9337](https://doi.org/10.3897/zookeys.632.9337)

Golovatch SI, Geoffroy J, Mauriès J (2006) Several new or poorly known cavernicolous millipedes (Diplopoda) from southern China. Arthropoda Selecta 15 (2): 81 - 89.

Gorochov AV (2014) Classification of the Phalangopsinae subfamily group, and new taxa from the subfamilies Phalangopsinae and Phaloriinae (Orthoptera: Gryllidae). Zoosystematica Rossica 23 (1): 7–88

Grantham HS et al (2009) Delaying conservation actions for improved knowledge: how long should we wait? *Ecol Lett*. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01287.x>

Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) Geneland: a program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712–715

Handschin E (1924) Neue myrmecophile und termitophile Collembolenformen aus Südamerika. *Neue Beiträge zur systematischen Insektenkunde* 3: 13–28

Hoch H, Ferreira RL (2013) *Potiguara Troglobia* gen. n., sp. n.–first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). *Deut Entomol*. <https://doi.org/10.1002/mmnd.201300003>

Hoffman RL (1982) Diplopoda. In: Parker SB, ed., *Synopsis and Classification of Living Organisms* 2: 689–724.

Holsinger JR (2000) Ecological derivation, colonization, and speciation. In: Winkens H, Culver DC, Humphreys WF (eds) *Ecosystems of the world: 30, subterranean ecosystems*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 399-415

Hopkin SP (1997). *Biology of the springtails:(Insecta: Collembola)*. OUP Oxford.

Howarth FG (1983) Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology* 28:365-389

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018) Projeto cenários: conservação de campos ferruginosos diante da mineração em Carajás / Frederico Drumond Martins, Luciana Hiromi Yoshino Kamino e Kátia Torres Ribeiro (organizadores). – 1. ed. – Tubarão (SC): Copiart

ICMBio/CECAV (2018) Áreas prioritárias para conservação do patrimônio espeleológico Brasileiro: primeira aproximação. Brasília-DF. Disponível em: <[https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/Areas\\_Prioritarias\\_Patrimonio\\_Espeleologico\\_2018.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/Areas_Prioritarias_Patrimonio_Espeleologico_2018.pdf) >. Acesso em: 20 Jan. 2021

Iniesta LFM, Bouzan RS, Souza CAR, Zampaulo RA, Cizauskas I, Brescovit AD (2023) Additions to the millipede fauna of an Amazonian ferruginous landscape: a new species of *Pseudoporatia* Golovatch, 1999 widespread in rock outcrops (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). *Zoosystema* 45 (16): 463-498

IUCN Standards and Petitions Committee (2022) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 15.1. Prepared by the Standards and Petitions Committee. [https://nc.iucnredlist.org/redlist/content/attachment\\_files/RedListGuidelines.pdf](https://nc.iucnredlist.org/redlist/content/attachment_files/RedListGuidelines.pdf). Accessed 30 November 2022

Jorgensen MC & Sierwald P (2010) Review of the Caribbean pyrgodesmid genus *Docodesmus* Cook with notes on potentially related genera (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). *International Journal of Myriapodology* 3(1): 25

Juberthie CB (2000) The diversity of the karstic and pseudokarstic hypogean habitats in the World. In: Wilkens H, Culver DC, Humpreys WF (Eds.) Ecosystems of the world: 30, subterranean ecosystems. Amsterdam: Elsevier Science. p. 17-39

Juberthie C, Delay B, Bouillon M (1980) Extension du milieu souterrain en zone non-calcaire: description d'un nouveau milieu et de son peuplement par les coleopteres troglobies. Mémoires de Biospéologie, Moulis 7: p. 19-52

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Leal-Zanchet AM, Souza ST, Ferreira RL (2014) A new genus and species for the first recorded cave dwelling Cavernicola (Platyhelminthes) from South America. ZooKeys 442: 1–15.

Leal-Zanchet AM, Poch A, Castillo O, Souza ST, Morais ALN, Ferreira RL, Riutort M (2015) New triclad species questioning the status of the suborder Cavernicola. In: XII International Symposium on Flatworm Biology, 2015, Oxford. Abstract book of the XII International Symposium on Flatworm Biology v. 1. p. 35

Leigh JW, Bryant D (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>

LEROY Y (1965) Exemple d'especies cryptiques distinguees par leurs emissions acoustiques (*Teleogryllus commodus* (Walk.) *Teleogryllus oceanicus* (Le Guillou), Gryllinae, Orth. Ens.) C. r. hebd. Sianc. Acad. Sci., Pavis 260, 5343-6.

Liu J, Slik F, Zheng S, Lindenmayer DB (2022) Undescribed species have higher extinction risk than known species. Conserv Lett 15:e12876. <https://doi.org/10.1111/conl.12876>

Mammola S, Isaia M, & Arnedo MA (2015) Alpine endemic spiders shed light on the origin and evolution of subterranean species. PeerJ, 3, e1384

Mammola S, Giachino PM, Piano E (2016) Ecology and sampling techniques of na understudied subterranean habitat: the Milieu Souterrain Superficiel (MSS). Sci Nat 103, 88

Mammola S et al. (2019) Scientists' warning on the conservation of subterranean ecosystems. Bioscience. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz064>

Mammola S et al. (2020) Fundamental research questions in subterranean biology. Biological Reviews 95: 1855–1872. <https://doi.org/10.1111/brv.12642>

Марин, ИН. (2020). The Quaternary speciation in the Caucasus: a new cryptic species of stygobiotic amphipod of the genus *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda: Niphargidae) from the Kumistavi (Prometheus) Cave, Western Georgia. Arthropoda Selecta. Русский артроподологический журнал, 29(4): 419-432

Mari-Mutt JA (1987) Puerto Rican Species of Paronellidae (Insecta: Collembola). Caribbean Journal of Science 23: 400–416

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2018) Portaria N° 463, de 18 de dezembro de 2018. Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Repartição de Benefícios da Biodiversidade Prioritárias para a Biodiversidade. Diário Oficial da União, Brasília/DF, seção 1, n. 243, p.160, 19 dez. 2018

Mills HB (1938) Collembola from Yucatan Caves. In: Fauna of the caves of Yucatan, 183–190

Miranda GS, Milleri-Pinto M, Gonçalves-Souza T, Giupponi APL, Scharff N (2016) A new species of *Charinus* Simon 1892 from Brazil, with notes on behavior (Amblypygi, Charinidae). ZooKeys 621: 15–36

Mitra SK (2002) Resuscitation of *Trichorypha* Schott 1893 (Collembola: Entomobryidae). Records of the Zoological Survey of India 100: 99–104

Nguyen M & Soto-Adames FN (2018) Annotated checklist of Afrotropical *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Hexapoda: Collembola: Paronellidae) and description of a new species from Madagascar. Zoosystema 40, 179–196. <https://doi.org/10.5252/zoosystema2018v40a10>

Nielsen ES et al (2023) Molecular ecology meets systematic conservation planning. Trends Ecol Evol. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.09.006>

Niemiller ML, Graening GO, Fenolio DB, Godwin JC, Cooley JR, Pearson WD, ... & Near TJ (2013) Doomed before they are described? The need for conservation assessments of cryptic species complexes using an amblyopsid cavefish (Amblyopsidae: Typhlichthys) as a case study. Biodiversity and Conservation 22(8): 1799–1820

Nikhil KL, Sharma VK (2017) On the origin and implications of circadian timekeeping: an evolutionary perspective. Em: Kumar V, ed. Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour. Heidelberg: Springer, pp.81–129

Oda GA, Caldas IL, Piqueira JRC, Waterhouse JM, Marques MD (2000) Coupled Biological Oscillators in a Cave Insect. J. Theor. Biol. 206:515–524. doi:10.1006/jtbi.2000.2151

Oliveira MPAD & Ferreira RL (2014) Aspects of the behavior and activity rhythms of *Rowlandius potiguar* (Schizomida: Hubbardiidae). PLoS One, 9(3), e91913

Otte D (1992) Evolution of cricket songs. Journal of orthoptera research 1: 25–49

Palacios-Vargas J, Ojeda M, Christiansen K (1985) Taxonomía y biogeografía de Troglopedetes (Collembola: Paronellidae) en América, con énfasis en las especies cavernícolas. Folia entomologica mexicana: 3–35

Pasquali V, Sbordoni V (2014) High variability in the expression of circadian rhythms in a cave beetle population. *Biol. Rhythm Res.* 45:925–939. doi:10.1080/09291016.2014.934077

Piló LB, Coelho AE, Reino JCR (2015) Espeleologia em rochas ferríferas: Cenário atual e conservação. 126-149 pp. In: RUCHKYS, U. A.; TRAVASSOS, L. E. P.; RASTEIRO, M. A.; FARIA, L. E. (Eds.). Patrimônio Espeleológico em Rochas Ferruginosas: propostas para sua conservação no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. Campinas/SP, Sociedade Brasileira de Espeleologia, 351 p

Pipan T, Culver DC (2017) The unity and diversity of the subterranean realm with respect to invertebrate body size. *Journal of Cave and Karst Studies* 79: 1–9

Pipan T, Deharveng L, & Culver DC (2020) Hotspots of Subterranean Biodiversity. *Diversity* 12(5): 209. <https://doi.org/10.3390/d12050209>

Potapov A, Bellini BC, Chown SL, Deharveng L, Janssens F, Kováč L, Kuznetsova N, Ponge J (2020) Towards a global synthesis of Collembola knowledge – challenges and potential solutions 92: 161–188. <https://doi.org/10.25674/so92iss3pp161>

Poulson TL, White WB (1969) The cave environment. *Sci.* 165:971–981. doi:10.1126/science.165.3897.971

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959

Prous X, Pietrobon T, Ribeiro MS, Zampaulo RA (2017) Bat necrophagy by a whip-spider (Arachnida, Amblypygi, Phryniidae) in a cave in the eastern Brazilian Amazon. *Acta Amazonica* 47: 365–368

Rendoš M, Miklisová D, Ľubomír K, Mock A (2020) Dynamics of Collembola (Hexapoda) in a forested limestone scree slope, Western Carpathians, Slovakia. *Journal of Cave and Karst Studies*, 18–29. <https://doi.org/10.4311/2018LSC0140>

Sánchez LE (1992) O sistema: unidade lógica de referência nos estudos espeleológicos. *Espeleo-Tema* 16: 3-14

Santos AJ et al. (2008) The arachnid order Schizomida in the Brazilian Atlantic Forest: a new species of *Rowlandius* and new records of *Stenochrus portoricensis* (Schizomida: Hubbardiidae). *Zootaxa* 1850 (1): 53-60

Santos AJ et al. (2013) Two new cave-dwelling species of the short-tailed whipscorpion genus *Rowlandius* (Arachnida: Schizomida: Hubbardiidae) from Northeastern Brazil, with comments on male dimorphism. *Plos One* 8(5): p. e63616

Santos AMM et al. (2007) Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of biogeography* 34(3): 437-446

Santos-Rocha IMD, Andreazze R, Bellini BC (2011) Registros de Collembola (Arthropoda, Hexapoda) no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Neotropica* 11: 167-170

Schött H (1903) Über zwei Gattungen der apterygoten Insecten. Redogorelse, fur Allmanna Laroverken I. Linkoping. Ekso och Vadstena. Underlasaret 3-16

Segovia JMG, Neco LC, Willemart RH (2018) On the habitat use of the Neotropical whip spider *Charinus asturius* (Arachnida: Amblypygi). *Zoologia*, 35: e12874

Shear WA (1973) Millipeds (Diplopoda) from Mexican and Guatemalan caves. *Accademia, Nazionale Dei Lincei, Problemi Attuali Di Scienza E Di Cultura* 171(2): 239-305

Simon KS, Pipan T, Culver DC (2007) A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 69:279-284

Sket B (2008) Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? *J Nat Hist* 42(21):1549-1563

Sluys R, Kawakatsu M, Ponde de Léon R (2005) Morphological stasis in an old and widespread group of species: Contribution to the taxonomy and biogeography of the genus *Girardia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40(2): 155-180

Sluys R, Kawakatsu M, Riutort M, Baguñà JÁ (2009) A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of Natural History* 43(29): 1763-1777

Soares G, Andrade R, Perroni G (2016) Troglomorphic fauna sampling methods in canga formations, Minas Gerais State, Brazil. 23rd International Conference on Subterranean Biology

Soriano-Morales S, Caballero-Hernández O, Dávila-Montes M, Morales-Malacara JB, Miranda-Anaya M (2013) Circadian locomotor activity and entrainment by light cycles in cave spiders (Dipluridae and Ctenidae) at the cave Los Riscos, Qro. México. *Biological Rhythm Research* 44: 949-955

Sousa PR, Souza-Silva M, Ferreira RL, Zampaulo RA (2017) Is an outstanding environment always preserved? When the most diverse cave in subterranean species becomes one of the most endangered in a landscape. *Revista Brasileira de Espeleologia* 2(8): 26-48

Souza S, Riutort M, Ferreira RL, Leal-Zanchet A (2018) An integrative taxonomic approach reveals the first marine triclad (Platyhelminthes) trapped in a cave from a semiarid Neotropical environment. *Invertebrate Systematics* 32(3): 627-638

Souza-Dias PGB, Bolfarini MP, Nihei SS, de Mello FAG (2014) *Endecous apterus*: a new species of cave cricket from northeast Brazil, with comments on the use of

subterranean habitats by Luzarinae crickets (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae: Luzarinae). *Zootaxa* 3784 (2): 120–130

Souza-Silva M, Ferreira RL (2016) The first two hotspots of subterranean biodiversity in South America. *Subterranean Biology* 19: 1–21. doi: 10.3897/subtbiol.19.8207

Souza-Silva M, Martins RP, Ferreira RL (2011) Cave lithology determining the structure of the invertebrate communities in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Biodiversity and Conservation* 8(20):1713-1729

Soto-Adames FN (2015) The dorsal chaetotaxy of first instar *Trogolaphysa jataca*, with description of twelve new species of neotropical *Trogolaphysa* (Hexapoda: Collembola: Paronellidae). *Zootaxa* 4032: 1–41. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4032.1.1>

Soto-Adames FN & Taylor SJ (2013) The dorsal chaetotaxy of *Trogolaphysa* (Collembola, Paronellidae), with descriptions of two new species from caves in Belize. *ZooKeys* 323: 35–74. <https://doi.org/10.3897/zookeys.323.4950>

Soto-Adames FN, Jordana R, Baquero E (2014) Comparative analysis of the dorsal chaetotaxy of Troglopedetes, *Trogolaphysa*, and *Campylothorax* supports the synonymization of tribes Paronellini and Troglopedetini (Collembola: Paronellidae). *Journal of Insect Science* 14: 278–278. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu140>

Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

Tahami MS, Hojat-Ansari M, Namyatova A, Sadeghi S (2021) Molecular phylogeny of cave dwelling *Eremogryllodes* crickets (Orthoptera, Myrmecophilidae) across Zagros Mountains and Southern Iran. *International Journal of Speleology* 50(2): 8

Thibaud J, Najt J (1988) Collemboles (Insecta) de l'Équateur IV. Paronellidae avec rérevision de quatre genres. *Bull. Mus. natn. Hist. nat.* 10: 719–730

Trajano E (2007) *Sistema Areias. 100 anos de estudos*. São Paulo: Redespeleo Brasil. 128p.

Trajano E, Bichuette ME (2010) Diversity of Brazilian subterranean invertebrates, with a list of troglomorphic taxa. *Subterranean biology* 7: 1-16.

Trajano E, Carvalho MR, Duarte L, Menna-Barreto L (2009) Comparative study on free-running locomotor activity circadian rhythms in Brazilian subterranean

fishes with different degrees of specialization to the hypogean life (Teleostei: Siluriformes, Characiformes). *Biological Rhythm Research* 40: 477–489

Trontelj P, Douady CJ, Fiser C, Gibert J, Goricki S, LeFebure T, Sket B, Zaks ˇek V (2009) A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macrostygobionts? *Freshw Biol* 54:727–744

Trujillo LA, Gual-Suárez F, Trujillo RE, Medellín RA (2021) Arachnids that feed on vertebrate carrion: necrophagy by the whip spider *Paraphrynus raptator* (Amblypygi: Phrynidae) and its relation to the feeding behavior of the woolly false vampire bat *Chrotopterus auritus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Arachnology* 49: 407–409

Valentim RF, Olivito JPR (2011) Unidade espeleológica Carajás: delimitação dos enfoques regional e local, conforme metodologia da in-02/2009 MMA. *Espeleotema* 22(1): 41-60

Verovnik R, Sket B, Prevorčnik S, Trontelj P (2003) Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica* 119(2): 155-165

Walker TJ (1964) Cryptic species among sound-producing ensiferan Orthoptera (Gryllidae and Tettigoniidae). *The Quarterly Review of Biology* 39(4): 345-355.

Wang X, Auler AS, Edwards RL, Cheng H, Cristalli PS, Smart PL, ... & Shen CC (2004) Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature* 432(7018):740-743

World Schizomida Catalog (2022) World Schizomida Catalog. Natural History Museum Bern. Disponível em: <http://wac.nmbe.ch>. Acesso em 27 de fev. de 2024

Wray DL (1953) New Collembola from Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 37: 140–150

ZAMPAULO RA (2015) Diversidade de espécies troglóbias em cavidades ferríferas do Parque Estadual da Serra do Rola Moça (PESRM), Minas Gerais. In: Rasteiro MA, Sallun Filho W (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. Anais... Campinas: SBE, 2015. p.87-97. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe\\_087-097.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe_087-097.pdf)>.

Zeppelini D, Brito RA, Lima ECA (2018) Three new species of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) from Central Brazilian shallow caves: side effects of long term application of environmental law on conservation. *Zootaxa* 4500 (1): 59-81

Zhang F, Bellini BC, Soto-adames FN (2019) New insights into the systematics of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha): first instar chaetotaxy, homology and classification. *Zoological Systematics* 44: 249–278. <https://doi.org/10.11865/zs.201926>

Zhu Q, Zhou Z, Zheng X, Wang T, Ma L, Shi F (2022) Phylogeny and phylogeography of *Diestramima* cave crickets (Orthoptera: Rhaphidophoridae): speciation driven by multiple dispersal and vicariance events. *Systematic Entomology* 47(1): 179-201

