

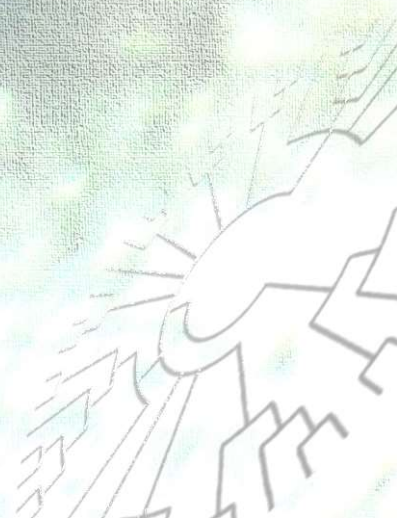


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO**  
**LINHA DE PESQUISA: PADRÕES E PROCESSOS EVOLUTIVOS**



**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**

**DIEGO DE MEDEIROS BENTO**  
Tese de Doutorado  
Natal-RN, junho de 2021



**DIEGO DE MEDEIROS BENTO**

**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**

Orientador: Sergio Maia Queiroz Lima (UFRN)

Coorientador: Rodrigo Lopes Ferreira (UFLA)

**Tese apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução, linha de pesquisa: Padrões e Processos Evolutivos, para a obtenção do título de “Doutor”.**

Junho, 2021

Natal – RN

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Bento, Diego de Medeiros.

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 / Diego de Medeiros Bento. - 2021.

161 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução. Natal, RN, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Maia Queiroz Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira.

1. Cavernas - Tese. 2. Caatinga - Tese. 3. Cox1 - Tese. 4. Delimitação de linhagens - Tese. 5. Educação ambiental - Tese. 6. Espécies ameaçadas - Tese. I. Lima, Sergio Maia Queiroz. II. Ferreira, Rodrigo Lopes. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 551.442

**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**

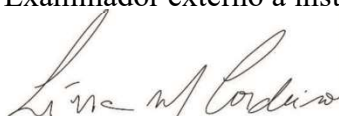
Tese aprovada em 29 de junho de 2021

**BANCA EXAMINADORA:**



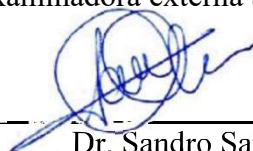
---

Dr. Antonio Mateo Solé Cava  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Examinador externo à instituição



---

Dra. Livia Medeiros Cordeiro  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul  
Examinadora externa à instituição



---

Dr. Sandro Santos  
Universidade Federal de Santa Maria  
Examinador externo à instituição



---

Dra. Christiane Ramos Donato  
Universidade Federal de Sergipe  
Examinadora externa à instituição



---

Dr. Sergio Maia Queiroz Lima  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Orientador/Presidente

**Junho, 2021**

**Natal/RN**

A meus pais, José e Neide, exemplos de dignidade, força e resiliência. O caminho é menos conturbado quando se tem pessoas iluminadas como guias.

A minhas filhas, Lelê e Gigi, razão maior de tudo e fontes constantes de inspiração.

A Amanda, companheira em todos os significados. Independente de qualquer coisa, será sempre uma das mulheres mais importantes na minha vida.

A ambientalistas e educadores. Nunca foi fácil, agora parece impossível, mas seguimos com a convicção de que a sustentabilidade e a educação são as bases do único caminho possível.

## AGRADECIMENTOS

Que etapa rica e diversa! Novas experiências, aprendizados, parcerias e amigos que espero levar para sempre.

Obrigado aos meus orientadores e amigos, Sergio e Rodrigo. Que a amizade e a parceria continuem rendendo frutos acadêmicos, socioambientais e campos sensacionais! Agradeço também a Bruno Bellini, que desde o mestrado tem sido também amigo e orientador, obrigado inclusive pelo “meio de campo” com Sergio, lá no início de tudo.

Obrigado à UFRN e ao Centro de Biociências, por meio do Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução. Agradeço demais aos professores e demais servidores do PPGSE pelos ensinamentos, conselhos e apoio durante todo o doutorado.

Obrigado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV). Que orgulho fazer parte de uma instituição com propósito tão nobre, que privilégio poder trabalhar com o que amo! Agradeço demais aos amigos Jocy, Uilson e, principalmente, Iatagan. Sr. Iatagan, um querido, vem sendo um amigo, orientador, companheiro inseparável, incansável e indispensável em todos os campos, uma biblioteca viva! Obrigado também à equipe do Parque Nacional da Furna Feia, Leonardo, Suiane, Lúcia e Carlos. É pessoalmente gratificante ver que esse lugar maravilhoso está cumprindo o objetivo de conservar uma biodiversidade única, que começa a ser revelada e valorizada não só pelos pesquisadores, mas também pelo seu principal guardião, o povo da região.

Obrigado aos amigos do LISE/GEEFAA, Aninha, Cadu, Eugênia, Flavinha, Jéssica, Márcio, Mateus Germano, Luciano, Luquinha, Lucas, Origilene, Roney, Sávio, Salu, Thais, Waldir, Yasmin, Yohran e Yuri. E, como que indo da lama ao caos, com certeza o principal resultado do doutorado foi descobrir uma galera que também se apaixonou pelas caveRNas: Matheus, Paolla, Valéria, Nathália e Carol. Tudo fica mais fácil quando se está junto de quem sabe curtir o trabalho!

Obrigado aos amigos do Instituto Tecnológico Vale (ITV-DS/Belém-PA), Guilherme, Santelmo, Jamily, Éder e Gisele. Agradeço demais pelo aprendizado na extração, sequenciamento, montagem de bibliotecas e toda a parte técnica, e igualmente pelos demais momentos nessa cidade linda e em outros lugares maravilhosos no meio da Amazônia.

Obrigado a Pedro Busana, da Faunart Illustration, pelo maravilhoso trabalho de ilustração da cartilha que compõe o quarto capítulo. Espero que este seja apenas o primeiro de muitos trabalhos de educação ambiental e valoração do patrimônio espeleológico potiguar.

Obrigado a todos da minha família, em especial aos meus “segundos” pais, Araújo e Eridan, que acompanharam tudo de perto, ajudaram a segurar várias barras juntos, sempre reforçando a convicção de que sou privilegiado por ter não um pai e uma mãe, mas dois de cada.

Obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço particularmente a Lindsey e Silvana, pelos momentos nos campos, congressos e tudo o mais! Embora não tenham entrado diretamente aqui, as “nossas” planárias são únicas, e já estão ajudando a contar a história desse lugar fantástico.

Apreendi muito mais sobre a biodiversidade subterrânea na Caatinga potiguar. E reforcei o que já sabia, que além da riqueza que temos abaixo dos nossos pés, há a riqueza que é o povo nordestino. Agradeço demais a esse povo forte, resistente, alegre, simples e acolhedor. Particularmente a Rielson e sua família maravilhosa, que nos receberam tão bem diversas vezes em seu sítio próximo ao PARNA da Furna Feia, e também ao povo de Felipe Guerra, especialmente Van, dona Rita e sua família, Geilson, Cícero, Dona Creusa, Kelly, dona Zila e, mais recentemente, Agnaldo e Ubiraci, pela honra de ter sido acolhido como filho de um lugar tão maravilhoso!

Este trabalho contou com apoio logístico e financeiro do ICMBio/CECAV e PARNA da Furna Feia, bem como do ITV-DS. O projeto está inserido no Termo de Compromisso de Compensação Espeleológica (TCCE) N° 1/2018, firmado entre ICMBio e Vale e com recursos geridos pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade (IABS). A coleta de material biológico foi autorizada por meio da licença SISBIO/ICMBio N° 54334.

*... Um fato geológico nos sertões do Norte substituiu, em seguida, estes acidentes, no criar idênticos empecilhos. Assim transposta a paisagem, o solo descaí para o sítio da Várzea, aparentando travessia fácil, mas realmente difficilima para uma tropa nas agitações do combate. Larga camada calcárea derrama-se por ali, aspérrima, patenteando notável fenômeno de decomposição atmosférica. Broqueadas de infinitas cavidades tangenceando-se em bordas de quinas vivas e cortantes, sarjadas de sulcos fundos de longas arestas rígidas e finas, feito lâminas de facas; eriçada de ressaltos pontiagudos; duramente rugosa em todos os pontos; escavando-se salteadamente em caldeirões largos e brunidos, patenteia impressionadoramente o influxo secular dos reagentes enérgicos, que longamente a trabalham. Corroeram-na, e perfuraram-na, e minaram-nas as chuvas ácidas das tempestades, depois das secas demoradas. Ela reflete, imóvel e corroída, a agitação revolta das tormentas. Pisando naqueles estrepes unidos e fortes, estraçoar-se-iam as mais resistentes botas e não haveria resguardos para topadas e tombos perigosíssimos...*

*Euclides da Cunha, em “Os Sertões”*



## 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, anfípodos 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.

**Palavras-chave:** Cavernas, Caatinga, Cox1, Delimitação de linhagens, Educação Ambiental, Espécies ameaçadas, Estado de conservação.

## GENERAL ABSTRACT

Caves have historically attracted attention of scientists due to troglobites, exclusively subterranean organisms that often have restricted distribution and high levels of endemism. Paleoclimatic events have been pointed out as the main responsible for the origin of troglotic species, and the west of the Jandaíra formation, northeast of Brazil, combines the occurrence of extensive karst areas, huge concentration of caves and subterranean aquifers in a region that is currently semi-arid. This region is recognized due to the richness and concentration of troglotic species, some of which (isopods, amphipods and planthoppers) have a relatively wide distribution in geologically and hydrologically distinct areas. Through phylogenetic and phylogeographic analyzes, we aim to assess the patterns of genetic variation of these taxa, investigate possible cryptic diversity and delimit operational taxonomic units (OTU's), as well as indicate the factors that possibly influenced their diversification. In addition, we aim to assess the conservation status of the lineages and identify priority areas for their conservation. With the exception of Cirolanidae sp.1 (Isopoda), the other taxa showed extensive diversity of cryptic lineages and, in addition to the identification of three OTU's for Cirolanidae sp.2 and five for *Potiberaba* (Amphipoda), *Kinnapotiguara troglobia* (Hemiptera) probably is a complex with seven cryptic species, with lineages restricted to microbasins (aquatic taxa) and outcrops (*Kinnapotiguara*). Only a small portion of the lineages are found in protected areas, while the majority occur in areas exposed to anthropic threats and can be considered endangered: Cirolanidae sp.1 was categorized as Vulnerable, while Cirolanidae sp.2 has one Least Concern (LC) and two Critically Endangered (CR) lineages. For *Potiberaba*, there are two LC, one Endangered (EN, *P. porakuara*) and two CR lineages, and, for *Kinnapotiguara*, there are four EN and three CR (including *K. troglobia*) lineages. Two priority areas were identified for the conservation of these lineages, with emphasis on the region of Abreu stream microbasin and Rosário outcrop, in Felipe Guerra municipality, which harbor half (eight, six of which are endemic) of the identified lineages. The Rosário outcrop, which can be considered a cave system and harbor 24 troglotic species, is a new hotspot of subterranean biodiversity. Finally, we present the booklet "Vida nas CaveRNas", designed as an educational strategy with the aim of arousing interest in caves, their inhabitants and their conservation.

**Keywords:** Caves, Caatinga, Conservation status, Cox1, Environmental Education, Lineages delimitation, Endangered species.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	16
HIPÓTESE E PREDIÇÕES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Biodiversidade duplamente oculta: espécies troglóbias crípticas reveladas no semiárido brasileiro</b>	<b>21</b>
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Antes que seja tarde: áreas prioritárias para conservação de espécies crípticas e ameaçadas de artrópodes troglóbios na Caatinga</b>	<b>54</b>
RESUMO	55
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAL E MÉTODOS	60
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
MATERIAL SUPLEMENTAR	94
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Um novo hotspot de biodiversidade subterrânea no Nordeste brasileiro</b>	<b>97</b>
RESUMO	98
ABSTRACT	99
INTRODUÇÃO	100
MATERIAL E MÉTODOS	102
RESULTADOS	106
DISCUSSÃO	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>Vida nas CaveRNas: proposta de cartilha como ferramenta de educação ambiental e material didático no ensino de Ciências</b>	<b>123</b>
RESUMO	124
ABSTRACT	125
INTRODUÇÃO	126
MATERIAL E MÉTODOS	128
RESULTADOS	130
DISCUSSÃO	153

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>154</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>159</b>

## 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). Menos frequentemente, há comunidades que se estruturam com base em raízes que atingem os sistemas subterrâneos (Howarth, 1983) e, raramente, a partir de matéria orgânica gerada por quimiossíntese (Kumaresan et al., 2014). Devido a tais limitações, cavernas foram consideradas por muito tempo ambientes oligotróficos, extremos e incapazes de abrigar uma fauna diversificada, já que limitariam o estabelecimento de inúmeras espécies e permitiriam a colonização apenas por organismos com pré-adaptações a tais características (Culver, 1982; Gilbert e 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 e 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 e Deharveng, 2002; Mammola et al., 2015). Em função disso, cavernas sempre despertaram a curiosidade dos pesquisadores e são importantes ambientes para a realização de estudos ecológicos e evolutivos (Culver e Pipan, 2009; Juan et al., 2010).

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). Essa formação corresponde a uma rampa carbonática, depositada sob regime marinho transgressivo no Cretáceo superior, que aflora em quase toda a porção emersa da Bacia Potiguar, ocupando uma área de mais de 13.000

km<sup>2</sup> no Norte do RN e Nordeste do Ceará (Bezerra et al., 2007) (Figura 1). No oeste da Formação Jandaíra são comuns afloramentos calcários intensamente carstificados (conhecidos localmente como lajedos), que concentram a quase totalidade das mais de 1.000 cavernas conhecidas na região (Cruz et al., 2010; CANIE/CECAV, 2020; Rabelo et al., 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 bioespeleológico, com riqueza e diversidade comparáveis a outras regiões cársticas e pseudocársticas 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; Fisler et al., 2013; Hoch e Ferreira, 2013; Bento et al., 2016; Souza et al., 2018; Bento et al., 2021).

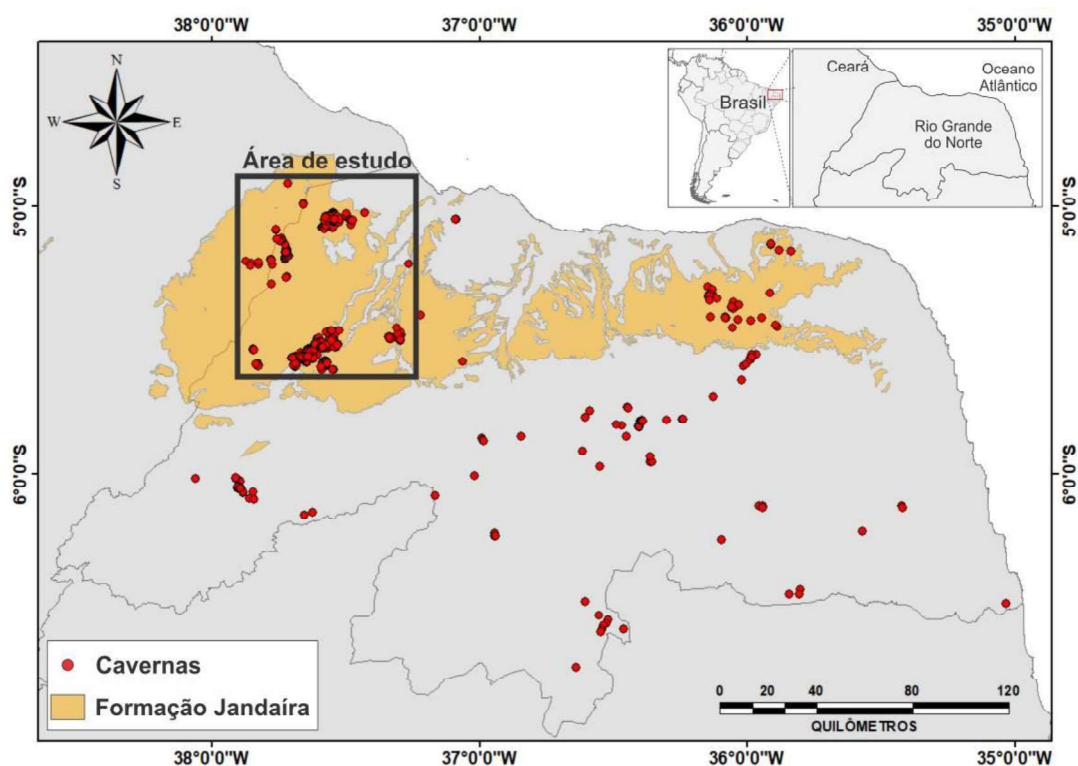


Figura 1. Distribuição das cavernas atualmente conhecidas nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com destaques para a formação Jandaíra e a área de estudo (oeste da formação Jandaíra).

Há o registro de 75 morfoespécies troglomórficas na formação Jandaíra (Ferreira et al., 2010; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021). Desse total, apenas seis estão descritas: *Kinnapotiguara troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 (Hemiptera: Fulgoromorpha: Kinnaridae),

novo gênero e o segundo registro de um Kinnaridae troglóbio no Brasil (Hoch e Ferreira, 2013); *Seborgia potiguar* Fis̆er, Zagnajster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Seborgidae) e *Potiberaba porakuara* Fis̆er, Zagnajster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Mesogammaridae), primeiros registros de tais famílias na América do Sul, sendo a segunda um novo gênero (Fis̆er et al., 2013); *Newportia potiguar* Ázara & Ferreira, 2014 (Scolopendromorpha: Scolopocryptopidae) (Ázara e Ferreira, 2014); *Hausera hauseri* Leal-Zanchet & Souza, 2014 (Tricladida: Dimarcusidae), novo gênero e primeiro registro da subordem Cavernicola na América do Sul (Leal-Zanchet et al., 2014); e *Shuysia triapertura* Leal-Zanchet & Souza, 2018 (Tricladida: Uteriporidae), o primeiro registro de uma planária da subordem Maricola troglóbia (Souza et al., 2018). A grande quantidade de novos gêneros (quatro dentre as seis espécies descritas) demonstra o elevado grau de desconhecimento sobre a fauna cavernícola Neotropical, além de destacar a grande relevância da área ao revelar numerosas espécies pertencentes a novos táxons acima de espécie.

Enquanto a maioria das morfoespécies troglóbias conhecidas nessa região 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 e 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, Zagnajster & 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 e Ferreira, 2013; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021) (Figura 2).

A diversidade desses artrópodes troglóbios e sua distribuição relativamente ampla, em uma região atualmente semiárida marcada por mudanças paleoclimáticas (incluindo transgressões e regressões oceânicas) (Fis̆er 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).



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* sp. (D). As barras brancas no canto inferior direito em cada imagem correspondem a 1 mm.

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). Além da evolução de morfologias semelhantes via evolução convergente, ou paralela, em grupos relacionados (Culver e Pipan, 2009), a estabilidade de habitats subterrâneos e sua conectividade limitada podem promover elevados níveis de endemismo (Gibert e Deharveng, 2002; Verovnik et al., 2003; Finston et al., 2007).

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 e 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 e Ferreira, 2013), é provável que isso ocorra apenas em escala local (Mammola et al., 2016; Pipan e 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.

## **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.

## **HIPÓTESE 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.

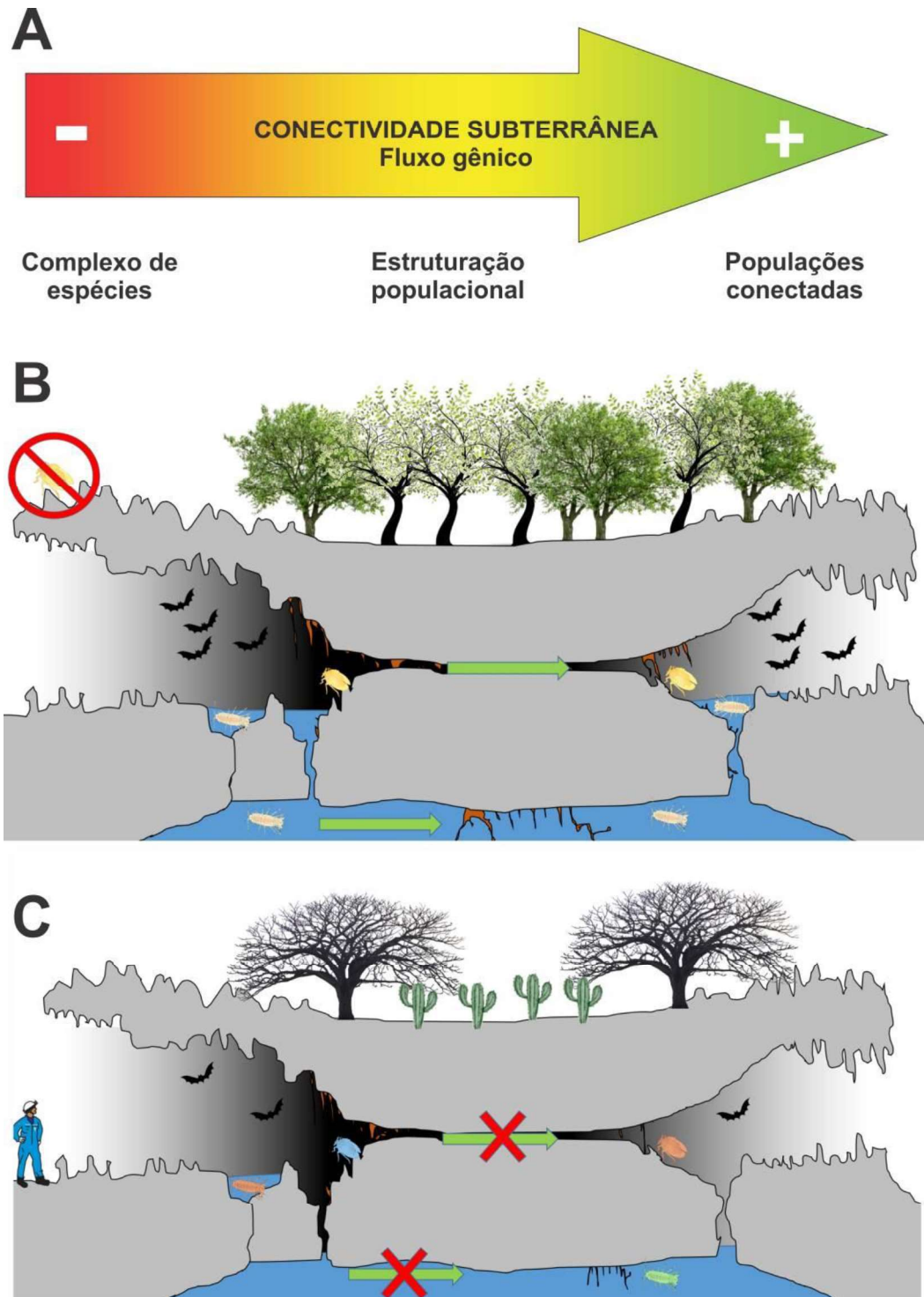


Figura 3. Padrões genéticos distintos esperados em função da existência ou não de conectividade biológica subterrânea. (A) São possíveis desde complexos de espécies (ausência de fluxo gênico por longo período) a populações conectadas de uma mesma espécie (fluxo gênico existente), passando por populações 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.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

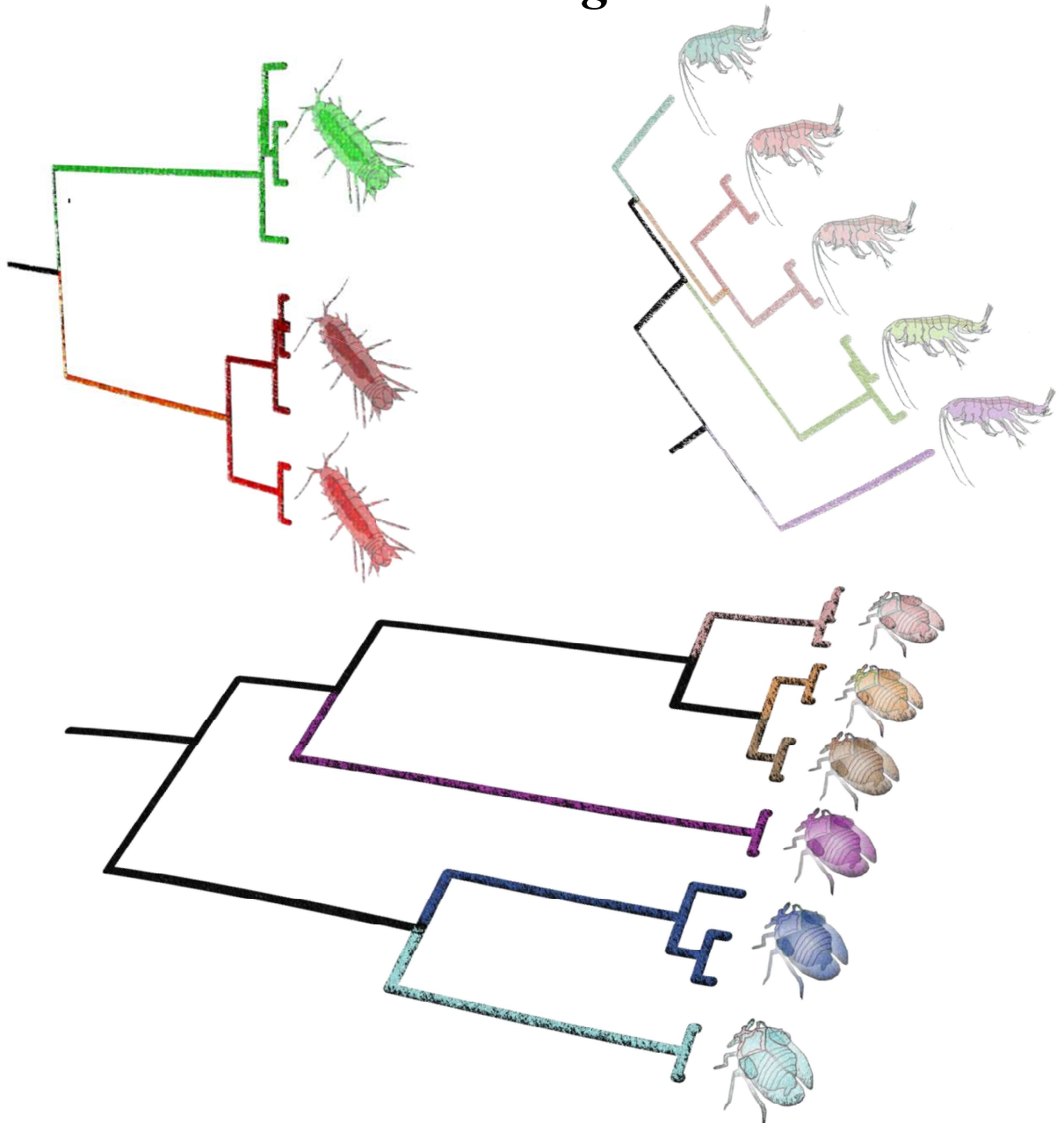
- Ázara LN, Ferreira RL (2014) Two new troglobitic *Newportia* (*Newportia*) from Brazil (Chilopoda: Scolopendromorpha). **Zootaxa** 3881 (3): 267–278.
- Bento DM, Ferreira RL, Prous X, Souza-Silva M, Bellini BC, Vasconcellos A (2016) Seasonal variations in cave invertebrate communities in the semiarid 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. **Biodiversity and Conservation**. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>.
- Bezerra FHR, Takeya MK, Sousa MOL, Nascimento AF (2007) Coseismic reactivation of the Samambaia fault, Brazil. **Tectonophysics** 430: 27–39.
- 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.
- CANIE/CECAV (2020) **Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>. Acesso em 30 dez. 2021.
- 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.
- Culver DC (1982) **Cave life, evolution and ecology**. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Culver DC, Pipan T (2009) **The biology of caves and other subterranean habitats**. Library of Congress Cataloging in Publication Data, Oxford University Press, Oxford.
- Ferreira RL, Martins RP, Prous X (2007) Structure of bat guano communities in a dry Brazilian cave. **Tropical Zoology** 20(1):55-74.
- Ferreira RL, Prous X, Bernardi LFO, Souza-Silva M (2010) Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e impactos. **Rev. Bras. Espeleol.** 1: 25-51.
- 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.; Zagamajster, M.; Ferreira, R.L. (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.
- Gibert J, Deharveng L (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. **Bioscience** 52: 473–481.
- Hoch H, Ferreira RL (2013) *Potiguara troglobia* gen. n., sp. n.—first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). **Dtsch Entomol Z** 60(1)33–40.
- 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.

- Howarth FG (1983) Ecology of cave arthropods. **Annual Review of Entomology** 28:365-389.
- Juan C, Guzik MT, Jaume D, Cooper SJB (2010) Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. **Molecular Ecology** 19:3865-3880.
- Juberthie C (2000) The diversity of the karstic and pseudokarstic hypogean habitats in the world. In: Wilkens H.; Culver, D.C.; Humphreys, W.F. (eds.). **Ecosystems of the World, Vol. 30: Subterranean Ecosystems**. Amsterdam: Elsevier. p. 17-39.
- Kumaresan D, Wischer D, Stephenson J, Hillebrand-Voiculescu A, Murrell JC (2014) Microbiology of Movile Cave - a chemolithoautotrophic ecosystem. **Geomicrobiology Journal** 31(3): 186-193.
- 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.
- 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, Jones A, Barberis M, Badino G, & Isaia M (2016) Ecology and sampling techniques of an understudied subterranean habitat: the Milieu Souterrain Superficiel (MSS). **The Science of Nature** 103(11-12), 88.
- 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.
- Pipán 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.
- Rabelo JG, Maia RP, Bezerra FHR, Silva CCN (2020) Karstification and fluid flow in carbonate units controlled by propagation and linkage of mesoscale fractures, Jandaíra Formation, Brazil. **Geomorphology** 357, 107090. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2020.107090>.
- Rosseti DF, Bezerra FHR, Dominguez JML (2013) Late Oligocene–Miocene transgressions along the equatorial and eastern margins of Brazil. **Earth-Science Reviews** 123:87-112.
- Simon KS, Pipán 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.
- 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.
- Trontelj P, Douady CJ, Fiser C, Gibert J, Goricki S, LeFebure T, Sket B, Zaksček V (2009) A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macrostygobionts? **Freshw Biol** 54:727–744.
- 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.

# CAPÍTULO I

## **Biodiversidade duplamente oculta: espécies troglóbias crípticas reveladas no semiárido brasileiro**

*Doubly-hidden biodiversity: cryptic  
troglobitic species unveiled in the Brazilian  
semiarid region*



## **Biodiversidade duplamente oculta: espécies troglóbias crípticas reveladas no semiárido brasileiro**

### **RESUMO**

Os troglóbios, organismos exclusivamente subterrâneos, frequentemente apresentam distribuição restrita e elevados níveis de endemismo. Eventos paleoclimáticos, tais como as glaciações ocorridas no hemisfério Norte e a simultânea aridificação em regiões tropicais, além de avanços e regressões oceânicas em regiões costeiras, são apontados como os principais responsáveis pela origem dessas espécies. No oeste da formação Jandaíra, Nordeste do Brasil, há extensas áreas cársticas, enorme concentração de cavernas e aquíferos subterrâneos em uma região atualmente semiárida e com marcantes mudanças paleoclimáticas (incluindo transgressões e regressões oceânicas). Há ainda grande riqueza e concentração de espécies troglóbias, algumas com distribuição relativamente ampla em áreas geológica e hidrologicamente distintas. Por meio de análises filogenéticas e filogeográficas, utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo oxidase 1 (cox1), objetivamos avaliar os padrões de variação genética em táxons troglóbios aquáticos (Isopoda e Amphipoda) e terrestres (Hemiptera), investigar possível diversidade críptica e delimitar Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's), bem como indicar os fatores que possivelmente influenciaram sua diversificação. Com exceção de *Cirolanidae* sp.1 (Isopoda), os demais grupos apresentaram linhagens crípticas. Além da identificação de três UTO's para *Cirolanidae* sp.2 e cinco para *Potiberaba* (Amphipoda), *Kinnapotiguara troglobia* (Hemiptera) provavelmente consiste em um complexo com outras seis espécies, indicando maior estruturação nos organismos terrestres do que nos aquáticos. Além disso, foi identificado que as drenagens são determinantes para a diferenciação das linhagens nos táxons aquáticos (*Cirolanidae* sp.2 e *Potiberaba*) e também para *Kinnapotiguara*, sendo que, nesse caso, os lajedos determinaram uma estruturação ainda maior. Somente uma pequena parcela das linhagens encontra-se em áreas protegidas, enquanto a maioria está em áreas expostas a ameaças antrópicas. As UTO's aqui delimitadas são apresentadas como prováveis espécies novas, recomendando-se estudos taxonômicos integrativos para descrevê-las formalmente, contribuindo assim para sua conservação.

**Palavras Chave:** Arthropoda, Cavernas, Delimitação de linhagens, Cox1, Filogeografia comparada, Troglóbios.

## Doubly-hidden biodiversity: cryptic troglobitic species unveiled in the Brazilian semiarid region

### ABSTRACT

Troglobites, exclusively underground organisms, often have restricted geographical distribution and high levels of endemism. Paleoclimatic events, such as the glaciations in the Northern Hemisphere and the simultaneous aridification in tropical regions, in addition to oceanic transgressions and regressions in coastal regions, are suggested to have influenced the origin of troglobites. In the west of the Jandaíra formation, Northeastern Brazil, there are extensive karst areas, a huge concentration of caves and underground aquifers in a currently semi-arid region with marked paleoclimatic changes (including oceanic transgressions and regressions). There is also great richness and concentration of troglobitic species, some of which are relatively widely distributed in geologically and hydrologically distinct areas. Through phylogenetic and phylogeographic analysis, using the mitochondrial gene Cytochrome oxidase 1 (cox1), we aimed to evaluate the patterns of genetic variation in aquatic (Isopoda and Amphipoda) and terrestrial (Hemiptera) troglobitic taxa. We also investigated possible cryptic diversity and delimited Operational Taxonomic Units (OTU's), as well as indicating the factors that possibly influenced its diversification. Except for *Cirolanidae* sp.1 (Isopoda), all the other taxa had cryptic lineages. We identified three UTO's for *Cirolanidae* sp.2 and five for *Potiberaba* (Amphipoda). Our results also show that *Kinnapotiguara troglobia* (Hemiptera) probably consists of a complex with six other species, indicating greater structuring in terrestrial than in aquatic organisms. Furthermore, we identified that drainages are crucial for the differentiation of lineages in aquatic taxa (*Cirolanidae* sp.2 and *Potiberaba*) and also for *Kinnapotiguara*, but, in this case, the limestone outcrops had an even greater influence. Only a small portion of the lineages are found in protected areas, while the majority are in areas exposed to human threats. The OTU's delimited here are presented as probable new species, recommending integrative taxonomic studies to formally describe them, thus contributing to their conservation.

**Keywords:** Arthropoda, Caves, Comparative phylogeography, Cox1, Lineage delimitation, Troglobites.

## INTRODUÇÃO

Cavernas sempre despertaram a curiosidade de pesquisadores, principalmente em função dos organismos troglóbios, que são exclusivamente subterrâneos (Juan et al., 2010). Tais espécies frequentemente apresentam especializações morfológicas (e.g. anoftalmia ou redução de estruturas oculares e pigmentação), fisiológicas e comportamentais resultantes do isolamento e evolução no ambiente subterrâneo, ou em função da ausência de pressões típicas dos ambientes superficiais (Culver e Pipan, 2009). No entanto, tais especializações podem levar também a uma perda na capacidade dispersiva, favorecendo o isolamento de linhagens e a especiação. Assim, os troglóbios frequentemente apresentam distribuição restrita e elevados níveis de endemismos, independente da escala de avaliação (Gilbert e Deharveng, 2002; Mammola et al., 2015).

Eventos paleoclimáticos têm sido apontados como os principais responsáveis pelo isolamento de linhagens ancestrais no ambiente subterrâneo e posterior origem de espécies troglóbias, tais como as glaciações ocorridas no hemisfério Norte, no Plioceno e Pleistoceno (White e Pipan, 2019), e o simultâneo estabelecimento de climas áridos em regiões tropicais, como a Austrália (Humphreys, 2019). Em regiões costeiras, avanços e regressões oceânicas ocorridos em diferentes períodos também têm sido apontados como responsáveis pela origem de diversas linhagens de estigóbios (troglóbios aquáticos) muitos dos quais considerados relictos oceânicos (Fisër et al., 2013; Alvarez et al., 2015; Souza et al., 2018; Humphreys, 2019; Delic et al., 2020).

A Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, é a maior floresta sazonalmente seca na América do Sul (Silva et al., 2017). Esse bioma é resultado de diversas mudanças paleoclimáticas ocorridas desde o Mioceno, responsáveis pela diversificação e adaptação de diversos grupos da fauna e da flora atuais ao clima cada vez mais árido e marcadamente sazonal (Werneck, 2011; Dupont et al., 2013; Costa et al., 2018; Silva e Souza, 2018). Adicionalmente, a região ao norte do semiárido brasileiro apresenta histórico de avanços e regressões oceânicas ocorridas desde o Cretáceo superior, com eventos de grandes proporções também no Mioceno (Rosseti et al., 2013; Bagni et al., 2020).

Nessa região há extensas áreas cársticas em função da ocorrência dos calcários da formação Jandaíra, depositados sob regime marinho transgressivo no Cretáceo superior (Bezerra et al., 2007). A formação Jandaíra corresponde a uma rampa carbonática que aflora em quase toda a porção emersa da bacia Potiguar, ocupando uma área de mais de

13.000 km<sup>2</sup> no norte do Rio Grande do Norte e nordeste do Ceará (Bezerra et al., 2007). Há, ainda, diversos afloramentos calcários intensamente carstificados (conhecidos localmente como lajedos) que concentram a quase totalidade das mais de 1.000 cavernas conhecidas na região (Cruz et al., 2010; CANIE/CECAV, 2020; Rabelo et al., 2020).

A região oeste da Formação Jandaíra apresenta grande relevância bioespeleológica em função da riqueza e concentração de espécies de invertebrados troglóbios, incluindo os únicos estigóbios relictos oceânicos atualmente registrados no Brasil (crustáceos e planárias) (Fišer et al., 2013; Souza et al., 2018). Como observado para outras regiões do mundo (Holsinger, 2000), a maioria das mais de 70 espécies troglóbias atualmente conhecidas para a área tem distribuição restrita, incluindo vários endemismos extremos. Quatro táxons, porém, têm ocorrência relativamente ampla (Ferreira et al., 2010; Fišer et al., 2013; Hoch e Ferreira, 2013; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021): 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; o gênero de anfípode *Potiberaba* Fišer, Zigmajster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Mesogammaridae), com ocorrência em diversas cavernas na mesma região dos cirolanídeos (Ferreira et al., 2010; Bento et al., 2016; Bento et al. 2021). A única espécie descrita deste gênero, *Potiberaba porakuara* Fišer, Zigmajster & Ferreira, 2013, tem ocorrência em uma caverna no extremo sul da distribuição (gruta dos Três Lagos, em Felipe Guerra/RN) (Fišer et al., 2013); e a cigarrinha troglóbia *Kinnapotiguara troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 (Hemiptera: Kinnaridae), que ocorre 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 e Ferreira, 2013; Bento et al., 2016; Bento et al. 2021), cortada pelo principal rio da região (rio Apodí-Mossoró).

Os crustáceos cirolanídeos e anfípodes são considerados relictos oceânicos (Ferreira et al., 2010; Fišer et al., 2013), e ocorrem em áreas geológica e distintas (Cruz et al., 2010; Bento et al., 2021). Em função da possibilidade de conexão por meio de aquíferos subterrâneos, estigóbios geralmente apresentam maior capacidade de dispersão e distribuição ampla se comparados aos troglóbios terrestres (Culver et al., 2009). Assim, espera-se que a estruturação gênica dos táxons aquáticos corresponda às diferentes bacias e aquíferos subterrâneos encontrados na região, com populações estruturadas ou espécies distintas dependendo do tempo de isolamento.

No caso de *K. troglobia*, foram identificadas pequenas variações na morfologia genital masculina entre indivíduos de diferentes cavernas que podem ser indícios de especiação (Hoch e Ferreira, 2013). O rio Apodi-Mossoró pode representar uma barreira biogeográfica a ser testada (Hoch e Ferreira, 2013), já que populações dessa espécie foram encontradas em cavernas de ambas as margens desse rio. Da mesma forma, diferentes tributários dessa drenagem 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 e Ferreira, 2013), espera-se que isso ocorra apenas em escala local, como observado em outras regiões do mundo (Mammola et al., 2016; Pipan e Culver, 2017). Nesse contexto, é possível que os lajedos funcionem como agrupamentos de cavernas conectadas por micro e mesocavidades, permitindo fluxo restrito de indivíduos de espécies troglóbias entre as cavernas próximas, de um mesmo lajedo (Mammola et al., 2020).

A diversidade desses artrópodes troglóbios e sua distribuição relativamente ampla, em uma região atualmente semiárida marcada por mudanças paleoclimáticas, tornam-nos ótimos modelos para testar padrões evolutivos e de diversificação em ambientes subterrâneos aquáticos e terrestres na Caatinga. Assim, objetivou-se avaliar os padrões de variação genética dos diferentes táxons em toda sua distribuição conhecida, investigar potencial diversidade críptica e delimitar as unidades taxonômicas operacionais (UTO's), bem como indicar os fatores ambientais que possivelmente influenciaram sua diversificação.

Assim, a distribuição atual das linhagens dos grupos-alvo deve refletir principalmente eventos de vicariância, mas também o nível de conectividade do ambiente subterrâneo e o potencial de dispersão de cada táxon. É provável que as divergências mais profundas correspondam a eventos do final do Mioceno: a última regressão oceânica de grandes proporções (Rosseti et al., 2013) para os grupos aquáticos (relictos oceânicos), e o surgimento do vale do rio Apodi-Mossoró (Bagni et al., 2020) para *K. troglobia*.

Adicionalmente, espera-se que a expansão das condições semiáridas ocorrida desde então (Werneck, 2011; Dupont et al., 2013; Silva et al., 2017; Costa et al., 2018; Silva e Souza, 2018), associada à intensificação da carstificação proporcionada pela exumação tardia dos calcários da formação Jandaíra (Bagni et al., 2020), tenham proporcionado a origem de diversas linhagens endêmicas e evolutivamente distintas. Tais linhagens estariam 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*, nesse caso tendo ainda o rio Apodi-Mossoró e seus tributários como barreiras biogeográficas.

Trata-se da primeira análise filogeográfica molecular comparada com foco em invertebrados troglóbios da Caatinga, incluindo filogenias com estimativas de tempo de divergência e métodos de delimitação de linhagens. A ampla amostragem, que inclui indivíduos de toda a distribuição geográfica conhecida de todos os grupos-alvo, permite a investigação dos padrões de diversificação e dos fatores que a influenciaram, contribuindo para a compreensão da história evolutiva não só dos táxons estudados, como também da própria área de estudo, e também no manejo e conservação dessa fauna troglóbia endêmica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de Estudo**

O estudo foi realizado em 30 cavernas e nascentes cársticas na formação Jandaíra, localizadas nos municípios de Baraúna, Felipe Guerra, Governador Dix-Sept Rosado (GDS Rosado) e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte (RN), e Quixeré, Estado do Ceará, Nordeste do Brasil (Tabela 1, Figura 1). Parte das cavernas está inserida no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF), unidade de conservação criada recentemente para proteger uma importante concentração de cavernas entre os municípios de Baraúna e Mossoró (Brasil, 2012).

A região insere-se na Caatinga e apresenta clima quente e semiárido, predominantemente do tipo BSh, segundo a classificação climática de Köppen (Alvares et al., 2013). A precipitação média anual situa-se em torno de 800mm (no entanto 70% da precipitação pode ocorrer em um único mês), que, aliada à alta incidência solar e à baixa umidade relativa leva a altas taxas de evaporação e déficit hídrico na maior parte do ano (Silva et al., 2017).

A área pode ser subdividida em regiões hidrográfica e geologicamente distintas. As cavernas e nascentes de Felipe Guerra, GDS Rosado e Mossoró estão na bacia hidrográfica do Rio Apodi-Mossoró e tiveram sua gênese condicionada pelo nível de base desse rio e seus tributários (rio do Carmo, no caso do Olho d'Água da Onça; riachos do Abreu, do Arapuá, do Cote e do Saco, no caso das cavernas às margens do rio Apodi-Mossoró – Figura 1C) (Cruz et al., 2010; Maia et al., 2012). Além dessas, a caverna da

Aposta, em Quixeré/CE, e a gruta do Olho d'Água do Cedro, em Baraúna/RN, encontram-se na microbacia do riacho do Bom Sucesso, um tributário do rio Apodi-Mossoró. Há ainda uma especificidade em relação à caverna dos Crotos, em Felipe Guerra/RN, que abriga uma drenagem epicárstica e desconectada do nível freático (Tabela 1, Figura 1H).

Já as cavernas localizadas no PNFF estão na Faixa Litorânea Norte de Escoamento Difuso (microbacias costeiras), área que corresponde a um soerguimento tectônico que, atuando como um divisor de águas, direciona a espeleogênese na região (Cruz et al., 2010; Maia et al., 2012). Nessa região há duas microbacias: a do Córrego da Mata, onde estão inseridas as cavernas do Lago, Furna Nova e Furna Feia, e a do Córrego do Virgínio, que engloba a caverna da Pedra Lisa (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1. Dados das cavernas e nascentes com espécies troglóbias alvo deste estudo. A primeira coluna (ID) indica os números pelos quais são identificadas as localidades na Figura 1. \* - Parque Nacional da Furna Feia; • - taxon registrado pela primeira vez neste estudo.

ID	Localidade	Sigla	Município/Estado	Coordenadas (SIRGAS 2000)		Hidrografia		Lajedo	Ocorrência e número de indivíduos sequenciados				Ambiente	
				Latitude (S)	Longitude (W)	Bacia	Microbacia		Cirolanidae sp.1	Cirolanidae sp.2	<i>Potiberaba</i> sp.	<i>K. troglobia</i>		
01	Furna Nova*	FNV	Baraúna/RN	05° 02' 03,21"	37° 34' 16,04"	Microbacias costeiras	Córrego da Mata	Furna Nova	7*				Córrego subterrâneo (freático)	
02	Caverna do Lago*	LGO	Baraúna/RN	05° 02' 11,40"	37° 34' 15,24"	Microbacias costeiras	Córrego da Mata	Furna Nova	5				Córrego e lagos subterrâneos (freático)	
03	Furna Feia*	FFA	Baraúna/RN	05° 02' 12,76"	37° 33' 36,64"	Microbacias costeiras	Córrego da Mata	Furna Feia				11*	Córrego subterrâneo (freático)	
04	Caverna Pedra Lisa*	PDL	Baraúna/RN	05° 02' 43,84"	37° 31' 18,85"	Microbacias costeiras	Córrego do Virgínio	Pedra Lisa	10*	5*	5*		Córrego subterrâneo (freático)	
05	Gruta do Olho d'Água do Cedro	ODC	Quixerê/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	Rio Apodi-Mossoró	Córrego do Bom Sucesso	Cedro	2*			3*	Lago subterrâneo (freático)	
06	Caverna da Aposta	APO	Quixerê/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	Rio Apodi-Mossoró	Córrego do Bom Sucesso	Lajedo Grande	2*				Lago subterrâneo (freático)	
07	Olho d'Água da Onça	ODO	Mossoró/RN	05° 28' 34,18"	37° 16' 48,73"	Rio Apodi-Mossoró	Rio do Carmo	Olho d'Água da Onça				5*	Nascente cárstica	
08	Olho d'Água da Furna	ODF	GDS Rosado/RN	05° 28' 50,55"	37° 32' 29,94"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Gangorinha				7*	Ressurgência (freático)	
09	Gruta Boca de Peixe	BPX	GDS Rosado/RN	05° 29' 04,56"	37° 33' 29,69"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Bonito				8	Subterrâneo terrestre, com raízes	
10	Gruta do Poço Feio	PFE	GDS Rosado/RN	05° 29' 15,51"	37° 33' 33,40"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Bonito				4	8*	Córrego subterrâneo e ressurgência (freático); terrestre, com raízes
11	Caverna do Marimbondo Caboclo/Água	CAG	GDS Rosado/RN	05° 29' 43,56"	37° 32' 43,46"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Angicos	12			1		Lago subterrâneo (freático)
12	Caverna SN9	SN9	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,33"	37° 32' 41,71"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Angicos					1*	Subterrâneo terrestre, com raízes
13	Caverna Sombra de Ubaia	SUB	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,64"	37° 32' 41,23"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Cote	Angicos					1*	Subterrâneo terrestre, com raízes
14	Caverna da Bota	BOT	Felipe Guerra/RN	05° 31' 30,85"	37° 37' 05,29"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Arapuá	Arapuá					7	Subterrâneo terrestre, com raízes
15	Caverna do Arapuá	ARA	Felipe Guerra/RN	05° 31' 48,25"	37° 36' 58,48"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Arapuá	Arapuá					9	Subterrâneo terrestre, com raízes
16	Caverna da Seta	SET	Felipe Guerra/RN	05° 32' 40,23"	37° 38' 03,10"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Arapuá	Arapuá					7	Subterrâneo terrestre, com raízes
17	Gruta da Rumana	RUM	Felipe Guerra/RN	05° 33' 54,12"	37° 39' 07,23"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Saco	Rumana					10	Subterrâneo terrestre, com raízes
18	Gruta do Buraco Redondo	BRD	Felipe Guerra/RN	05° 34' 42,98"	37° 39' 04,99"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Saco	Meio					9	Subterrâneo terrestre, com raízes
19	Gruta dos Troglóbios	TRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 24,27"	37° 39' 40,57"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Arapuá	Rosário	11			5	12	Lago subterrâneo (freático); terrestre, com raízes
20	Caverna dos Crotos	CRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 37,92"	37° 39' 30,89"	Rio Apodi-Mossoró	Drenagem epicárstica / Riacho do Arapuá	Rosário		8		2	6	Lago subterrâneo (epicarste); terrestre, com raízes
21	Gruta da Descoberta	DBT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 47,50"	37° 39' 55,77"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Arapuá	Rosário					9	Subterrâneo terrestre, com raízes

22	Olho d'Água do Tetéu	ODT	Felipe Guerra/RN	05° 34' 02,63"	37° 40' 13,88"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Tetéu		4*		Nascente cárstica	
23	Caverna dos Dois	CDS	Felipe Guerra/RN	05° 34' 06,51"	37° 40' 50,42"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Alfredo			7*	Subterrâneo terrestre, com raízes	
24	Caverna Duas Urtigas	URT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,48"	37° 41' 00,01"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa			2*	Subterrâneo terrestre, com raízes	
25	Caverna da Raposa	RAP	Felipe Guerra/RN	05° 33' 36,15"	37° 41' 03,77"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa			2*	Subterrâneo terrestre, com raízes	
26	Lapa I cave	LAI	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,50"	37° 41' 18,31"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa			8*	Subterrâneo terrestre, com raízes	
27	Lapa I/Engano	LIE	Felipe Guerra/RN	05° 33' 41,89"	37° 41' 42,25"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa			6	Subterrâneo terrestre, com raízes	
28	Caverna do Mosteiro	MOS	Felipe Guerra/RN	05° 33' 45,61"	37° 41' 44,19"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa			6*	Subterrâneo terrestre, com raízes	
29	Caverna Boa	CBO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 59,50"	37° 41' 52,43"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Lapa	9*		3*	2*	Córrego e lagos subterrâneos (freático); terrestre, com raízes
30	Gruta dos Três Lagos	TLG	Felipe Guerra/RN	05° 35' 34,40"	37° 41' 12,70"	Rio Apodi-Mossoró	Riacho do Abreu	Brejo	9	4	14		Lago subterrâneo e ressurgência (freático)
Total									67	17	64	120	

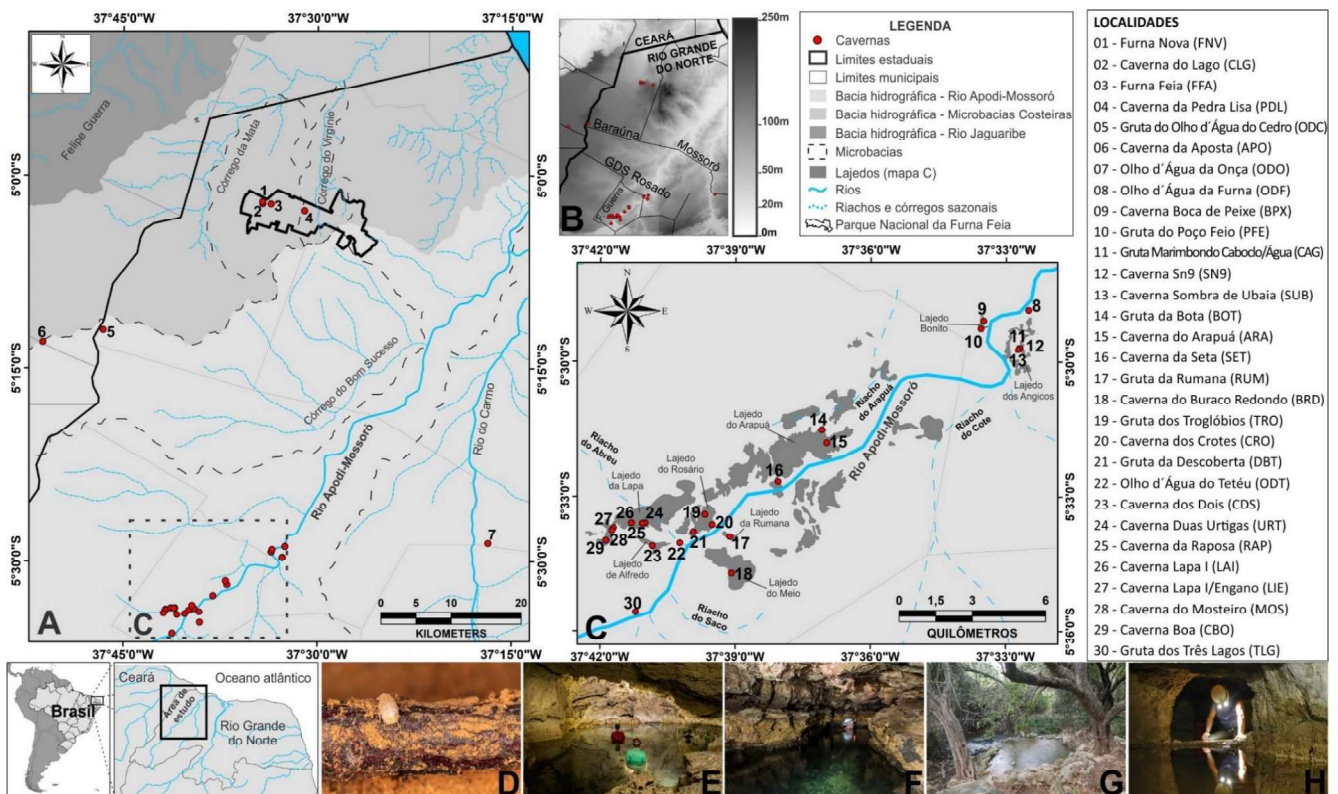


Figura 1. Cavernas e nascentes cársticas amostradas. (A) Localização das cavernas e nascentes cársticas onde foram coletados indivíduos dos grupos-alvo deste estudo; (B) relevo; (C) ampliação da área com grande concentração de localidades nos municípios de Felipe Guerra e GDS Rosado; e ambientes onde são encontrados os táxons-alvo do estudo: (D) ambiente terrestre com raízes (é possível ver uma ninfa de *K. troglobia* sobre a raiz) na caverna do Arapuá, (E) lago subterrâneo freático da gruta dos Três Lagos, (F) córrego subterrâneo freático na gruta do Poço Feio, (G) nascente cárstica do Olho d'Água do Tetéu e (H) lago epicárstico na caverna dos Crotos. Em função da impossibilidade de visualização adequada, devido à escala, os lajedos não são apresentados em A.

## **Coleta de amostras**

Além das cavernas para as quais já havia registros dos grupos-alvo (Ferreira et al., 2010; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021), foram realizadas coletas em outras cavernas e nascentes cársticas com habitats adequados em toda a área de ocorrência dos táxons.

Todos os habitats potenciais (áreas úmidas e com raízes, no caso de *K. troglobia*; poças d'água e córregos subterrâneos, raízes e acúmulos de matéria orgânica submersos, para os invertebrados aquáticos) foram inspecionados visualmente. Indivíduos de *K. troglobia* foram coletados manualmente com o uso de pinças e pincéis, já para os invertebrados aquáticos foram utilizadas também redes de aquariofilia e covos com iscas consistindo em pedaços de fígado bovino (deixados nos corpos d'água por 24 horas). Todos os invertebrados coletados foram conservados em etanol absoluto (99,5% P.A) e armazenados sob refrigeração (-20° C), triados e identificados até o menor nível taxonômico possível (com utilização de estereomicroscópio) e encaminhados a especialistas para confirmação dos táxons e possível descrição de novas espécies.

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

O DNA total foi extraído de tecidos dos indivíduos preservados em etanol utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Foram 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).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25µl contendo 5 µl de tampão 5x GoTaq Reaction (Promega), 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl de dNTP (2mM), 2 µl de DMSO, 0,5 µl de cada primer (10mM), 0,2 µl da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 4 µl de DNA genômico total. O perfil de termociclagem incluiu 1 ciclo de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 48°C, 1 minuto a 72°C; e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

Todos os produtos de PCR foram 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). As reações de sequenciamento, em ambos os sentidos, foram realizadas em volumes de reação de 10 µl contendo 0,5 µl de BigDye 2,5, 2 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems), 2 µl dos produtos de PCR e 0,5 µl de primer. O perfil de termociclagem foi: um ciclo de 1 minuto a 96°C, 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a

60°C. Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3730-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **Análises dos dados**

As sequências consenso foram montadas com uso do software Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime/>) e alinhadas usando ClustalW (Thompson et al., 1994), implementado no programa Mega X (Kumar et al., 2018), seguidas por inspeção visual para ajustes finais. Adicionalmente, as sequências de DNA foram traduzidas em aminoácidos para verificar stop códons prematuros, indels ou inserções de DNA nuclear. Testes de saturação foram realizados no programa DAMBE7 (Xia, 2018).

Para as análises filogenéticas, foram utilizados apenas haplótipos únicos, exceto quando compartilhados entre diferentes localidades (no intuito de manter a informação da distribuição geográfica), e para tanto uma análise de distribuição de haplótipos foi realizada com o programa DNAsp v.5 (Librado e Rozas, 2009). O modelo de substituição de nucleotídeos para cada conjunto de dados foi selecionado no programa JmodelTest 2 (Darriba et al., 2012) a partir dos menores valores de BIC (Bayesian Information Criterion) e AICc (corrected Akaike Information Criterion). Utilizando o modelo evolutivo selecionado (HKY+I+G para Cirolanidae Sp.1, GTR+G para Cirolanidae sp.2, TrN+G para *Potiberaba* e HKY+I para *K. troglobia*), foram realizadas inferências bayesianas (IB) no Beast 2 (Bouckaert et al., 2019). Adicionalmente, foram realizadas reconstruções filogenéticas de máxima verossimilhança (usando os modelos GTR GAMMA I para Cirolanidae sp.1 e *K. troglobia* e GTR GAMMA para Cirolanidae sp.2 e *Potiberaba*, com as opções -f a -x 1 e 1000 réplicas de bootstrap) usando o RAxML 8 (Stamatakis, 2014) implementado no Geneious Prime. Sequências de Cirolanidae sp.2 foram usadas como grupo externo de Cirolanidae sp.1 (e vice-versa), enquanto *Latissus dilatatus* (Hemiptera: Issidae; acesso GenBank: KX702947.1) e *Gammaracanthus loricatus* (Amphipoda: Gammaracanthidae; acesso GenBank: JF965998.1) foram utilizados como grupo externo para *K. troglobia* e *Potiberaba*, respectivamente.

IB e análises de tempo de divergência foram realizadas usando a opção “Relaxed Clock Log Normal”, após o Teste de Razão de Verossimilhança, executado no DAMBE7 (Xia, 2018), descartar a hipótese de relógio molecular estrito para todos os táxons. Foram utilizadas as taxas de mutação de 1.25%/Ma (0.00625 subst./site/Ma) (isópodes Stenasellidae subterrâneos; Yoshino et al. 2018) para Cirolanidae; 1,4%/Ma (0.007 subst./site/Ma) (Anfípodes Haustoriidae, Hancock et al., 2019) para *Potiberaba* e 2.3%/Ma (0.0115 subst./site/Ma) (taxa mitocondrial para insetos; Wessel et al., 2013) para *K. troglobia* e modelo coalescente com

população constante, com quatro corridas independentes para cada taxon com MCMC de  $100 \times 10^6$  gerações e amostragem a cada 5000 gerações. A convergência das corridas foi verificada no Tracer v1.7 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), certificando-se de que todos os valores de ESS eram maiores que 200. A topologia de consenso e valores de probabilidades posteriores foram obtidas no programa TreeAnnotator (aplicando burnin de 15%), com posterior edição gráfica das árvores geradas no FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Com o objetivo de identificar unidades taxonômicas operacionais (UTOs, aqui interpretadas como potenciais espécies), foram utilizados quatro diferentes métodos de delimitação de linhagens para verificar a distribuição dos grupos genéticos nos táxons-alvo. Foram utilizadas tanto abordagens exploratórias, como o ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery, Puillandre et al., 2012) e o mGMYC (multiple threshold Generalized Mixed Yule Coalescent, Fujisawa e Barraclough, 2013), como de validação como o BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography, Flouri et al., 2018), além do bPTP (Bayesian Poisson Tree Process, Zhang et al., 2013).

O ABGD consiste no agrupamento automático de sequências em potenciais grupos (linhagens ou espécies) de acordo com sucessivos valores de barcode gap (a diferença entre a maior distância intraespecífica e a menor interespecífica). As análises foram realizadas no servidor ABGD web (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>), usando a opção K2-P, priors intraespecíficos variando de 0.001 a 0.25 em 10 steps, além de relative gap width (X) de 1.5.

Os outros métodos consistem em análises com base em árvores filogenéticas que incorporam modelos populacionais, tais como a teoria da coalescência, buscando determinar o ponto de transição entre processos populacionais e de especiação com base na acumulação de substituições entre sequências (bPTP) ou no tempo de divergência (mGMYC). Com base nas árvores geradas nas análises de inferências bayesianas e Máxima Verossimilhança, conforme detalhado anteriormente, os métodos mGMYC (<https://species.h-its.org/gmyc/>) e bPTP (<https://species.h-its.org/ptp/>) foram executados no servidor “Species delimitation server” (<https://species.h-its.org/>).

Já o BPP usa conjuntos de dados genéticos para adaptar polimorfismos ancestrais e processos coalescentes usando MCMC para calcular probabilidades posteriores de árvores de espécies distintas (Flouri et al., 2018). Foram utilizados quatro cenários combinando grandes e pequenas populações ancestrais e divergências profundas e recentes, que foram realizados três vezes cada,  $5 \times 10^5$  gerações e burnin de 5.000: (a) grande população ancestral com profundas

divergências,  $\theta \sim \text{invgamma} (2, 0.1)$  e  $\tau \sim \text{invgamma} (2, 0.1)$ ; (b) grande população ancestral com divergências recentes,  $\theta \sim \text{invgamma} (2, 0.1)$  e  $\tau \sim \text{invgamma} (3, 0.002)$ ; (c) pequena população ancestral com profundas divergências,  $\theta \sim \text{invgamma} (3, 0.002)$  e  $\tau \sim \text{invgamma} (2, 0.1)$ ; e (d) pequena população ancestral com divergências recentes,  $\theta \sim \text{invgamma} (3, 0.002)$  e  $\tau \sim \text{invgamma} (3, 0.002)$ .

As UTOs foram definidas a partir da concordância entre a maioria dos métodos de delimitação de linhagens e a distribuição geográfica. Posteriormente, distâncias genéticas médias intra (entre indivíduos de uma mesma UTO) e interespecíficas (entre indivíduos de diferentes UTOs) foram estimadas com o modelo de substituição K2P, usando o MEGA X.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), para testar as hipóteses de estruturação genética dos grupos-alvo de acordo com a distribuição das localidades nos diferentes tributários (microbacias) e afloramentos calcários (lajedos).

## RESULTADOS

Foram coletados e sequenciados indivíduos de todos os grupos-alvo e em todas as localidades para as quais havia ocorrência registrada. Além disso, foram registradas novas ocorrências que resultaram na ampliação da distribuição de todos os táxons (Tabela 1, Figura 1), de forma que este estudo contempla todos os locais de ocorrência em toda a área de distribuição atualmente conhecida dos grupos-alvo.

Foram obtidas sequências parciais do *cox1* de 593 pb de 67 indivíduos de *Cirolanidae* sp.1, com a identificação de 32 haplótipos em nove cavernas, e de 17 indivíduos de *Cirolanidae* sp.2 (nove haplótipos) de três cavernas. Para *Potiberaba*, foram obtidas sequências parciais do *cox1* de 588 pb de 64 indivíduos e identificados 23 haplótipos em nove cavernas e duas nascentes cársticas. Por fim, foram obtidas sequências de 659 pb de 120 indivíduos de *Kinnapotiguara* (19 haplótipos) de 19 cavernas.

### **Análises filogenéticas e delimitação de linhagens**

Para *Cirolanidae* sp.1, a IB apontou três clados, dois com altos valores de probabilidades posteriores, muito embora tal divisão não tenha suporte na ML e nem em três dos quatro métodos de delimitação de linhagens, que indicam um único agrupamento para todas as localidades independentemente da divisão hidrográfica entre bacias e microbacias na área de ocorrência (Figura 2A). Para *Cirolanidae* sp.2 a situação é completamente distinta, e há robusto suporte tanto na IB como na ML, além de concordância entre todos os quatro métodos de

delimitação de linhagens, para três clados monofiléticos, cada um correspondente a uma caverna e microbacia distintas (Figura 2B). Além da separação entre a linhagem da caverna da Pedra Lisa (PDL) (que divergiu há cerca de 7.66 Ma; 2.66-17.73 HPD), em região geograficamente distante e hidrologicamente distinta, há ainda linhagens diferentes nas cavernas Três Lagos (TLG) e Crotes (CRO) (que divergiram há aproximadamente 2.38 Ma; 0.53-9.97 HPD), próximas e localizadas às margens do rio Apodi-Mossoró. A drenagem onde o táxon ocorre na CRO, no entanto, é epicárstica (Figura 1H) e sem conexão com o nível freático.

Em *Potiberaba*, há concordância entre os clados observados e os padrões de drenagens. Há robusto suporte na IB e ML, corroborado pelos quatro métodos de delimitação de linhagens, para os clados formados exclusivamente pelas localidades do Olho d'Água da Onça (ODO) (que divergiu há aproximadamente 5.88 Ma; 4.10-8.02 HPD) e da PDL (que divergiu há cerca de 2.71 Ma; 1.81-3.76 HPD) (Figura 2C). Tais linhagens encontram-se em microbacias distintas entre si e das demais localidades, com o ODO situado na microbacia do Rio do Carmo e a PDL na microbacia do Córrego do Virgínio. Apesar de geograficamente próxima a essa última, a localidade da Furna Feia (FFA) encontra-se em microbacia distinta - Córrego da Mata - e embora com menor suporte na IB e ML, os clados formados exclusivamente pelas localidades FFA e CRO (drenagem epicárstica sem conexão com o nível freático, como já mencionado para *Cirolanidae* sp.2) são linhagens distintas segundo três (mGMYC, bPTP e BPP) dos quatro métodos utilizados e divergiram, respectivamente, há cerca de 2.13 Ma [1.40-2.97 HPD] e 1.7 Ma [1.13-2.35 HPD], respectivamente. Não há concordância entre a IB e ML (baixos valores de PP e/ou bootstrap), nem entre os métodos de delimitação de linhagens, para os clados envolvendo as demais localidades (incluindo a localidade-tipo para *P. porakuara*, TLG) (Figura 2C).

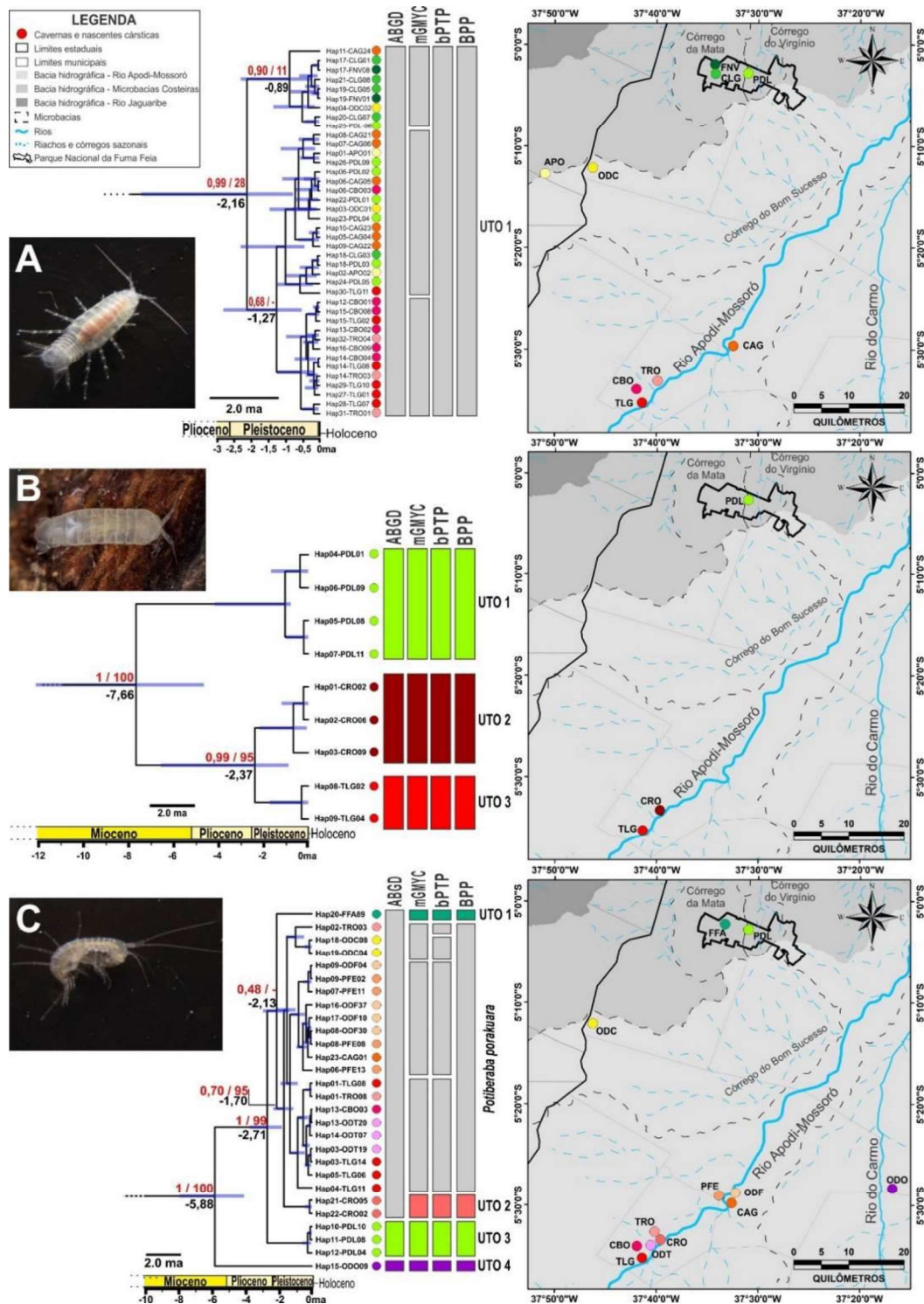


Figura 2. Árvores filogenéticas de consenso resultantes da inferência bayesiana com relógio molecular, além dos resultados dos métodos de delimitação de linhagens e localização das cavernas e nascentes cársticas com ocorrência dos táxons aquáticos, *Cirolanidae* sp.1 (A), *Cirolanidae* Sp.2 (B) e *Potiberaba* (C). Em cada nó das árvores são apresentadas as probabilidades posteriores (acima à esquerda), 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 com 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação gráfica, os grupos externos foram removidos da filogenia.

Em *Kinnapotiguara*, há suporte geralmente robusto, tanto na IB como na ML, para a formação de sete clados monofiléticos, em sua maioria correspondendo à distribuição das cavernas de acordo com os afloramentos calcários (lajedos), o que é consistente com os resultados dos métodos de delimitação de linhagens (Figura 3). Segundo as estimativas da IB com relógio molecular, a divergência mais profunda ocorreu entre as linhagens de margens opostas do Rio Apodi-Mossoró e teria ocorrido há aproximadamente 6.14 Ma [4.2-8.46 HPD]. As duas principais linhagens da margem esquerda do rio teriam divergido há cerca de 4.7 Ma [3-6.55 HPD] e as da margem direita há 2.88 Ma [1.45-4.53 HPD]. As cinco linhagens que correspondem aos clados que englobam as localidades em um mesmo lajedo, na margem esquerda do rio Apodi-Mossoró, divergiram aproximadamente no mesmo período (Pleistoceno médio, por volta de 1,5 Maa) (Figura 3).

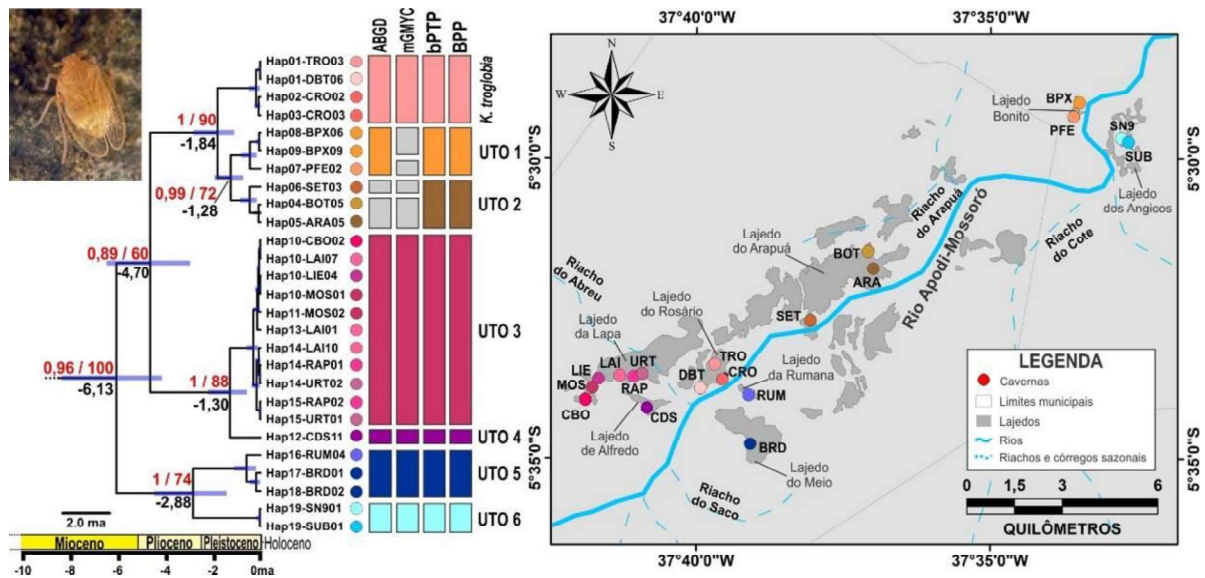


Figura 3. Árvore filogenética de consenso resultante da inferência bayesiana com relógio molecular, além dos resultados dos métodos de delimitação de linhagens e localização das cavernas com ocorrência de *k. troglobia*. Em cada nó das árvores são apresentadas as probabilidades posteriores (acima à esquerda), 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 com 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação gráfica, o grupo externo foi removido da filogenia.

### Distâncias genéticas

As distâncias genéticas intraespecíficas (entre indivíduos de uma mesma UTO) foram baixas para todos os táxons-alvo, chegando a 0,74% para *Cirolanidae* sp.1 e variando de 0,084% a 0,37% para *Cirolanidae* sp.2, de 0 a 0,93% para *Potiberaba* e de 0 a 0,8% para *Kinnapotiguara* (Tabelas 2, 3 e 4).

Os táxons aquáticos apresentaram valores de distância genética menores do que o terrestre. No entanto, os valores entre os táxons aquáticos foram bem diferentes. Enquanto *Cirolanidae* sp.1 apresentou baixos valores de distância genética média entre todas as cavernas (resultando em distância média intraespecífica de 0,74%), *Cirolanidae* sp.2 apresentou maiores valores de distância genética entre as linhagens de diferentes localidades (2,1 % entre TLG e CRO, que estão geograficamente próximas, e variando de 9,2% a 9,5% entre estas e PDL; Tabela 2, Figura 2B).

Tabela 2. Distâncias genéticas médias (K2P) intraespecíficas (na diagonal, em negrito) e entre as diferentes UTO's identificadas para *Cirolanidae* sp.2.

	UTO 1 (PDL)	UTO 2 (CRO)	UTO 3 (TLG)
UTO 1 (PDL)	<b>0,37%</b>		
UTO 2 (CRO)	9,5%	<b>0,16%</b>	
UTO 3 (TLG)	9,2%	2,1%	<b>0,084%</b>

As menores distâncias genéticas médias em *Potiberaba* foram encontradas entre *P. porakuara* e a UTO 2 (linhagem com ocorrência na drenagem epicárstica na CRO), 1,74% (Tabela 3). Valores mais elevados foram encontrados entre as demais UTO's - com destaque para a UTO 4 (nascente cárstica ODO), na microbacia do rio do Carmo, que apresenta distâncias genéticas variando de 6,1% a 7,6% em relação às outras localidades. Cabe destacar que as UTOs 1 (FUF) e 3 (PDL), geograficamente próximas, mas em microbacias distintas, apresentaram elevadas distâncias genéticas entre si e entre todas as demais localidades (Tabela 3, Figura 2C), indicando o papel das barreiras que delimitam as drenagens.

Tabela 3. Distâncias genéticas médias (K2P) intraespecíficas (na diagonal, em negrito) e entre as diferentes UTO's identificadas para *Potiberaba*.

	<i>P. porakuara</i>	UTO 1 (FFA)	UTO 2 (CRO)	UTO 3 (PDL)	UTO 4 (ODO)
<i>P. porakuara</i>	<b>0,93%</b>				
UTO 1 (FFA)	2,6%	<b>0</b>			
UTO 2 (CRO)	1,7%	3,1%	<b>0,17%</b>		
UTO 3 (PDL)	2,9%	4,1%	3,7%	<b>0,17%</b>	
UTO 4 (ODO)	6,1%	6,8%	6,4%	7,6%	<b>0</b>

As cigarrinhas *Kinnapotiguara* apresentaram as maiores variações entre as distâncias genéticas médias entre diferentes UTO's (variando de 3 a 14,7%), com os valores mais elevados entre linhagens de margens opostas do rio Apodi-Mossoró (Tabela 4; Figura 3), como esperado.

No entanto, mesmo entre UTO's em uma mesma margem as distâncias genéticas foram elevadas e apresentaram padrões distintos. Enquanto as linhagens da margem direita do rio (UTO 5 – caverna da Rumana, RUM, e caverna do Buraco Redondo, BRD, e UTO 6 – Lajedo dos Angicos) apresentaram distância genética de 7,1%, *K. troglobia* e as UTO's 1 (Lajedo Bonito) e 2 (Lajedo do Arapuá), na margem esquerda, apresentam distâncias genéticas variando de 3,4 a 4,1% independentemente da distância geográfica – a distância entre o lajedo do Rosário (onde estão as cavernas com ocorrência de *K. troglobia*) e o lajedo Bonito (UTO 1) é praticamente a mesma da que separa os lajedos da Rumana e do Meio (UTO 5) e o lajedo dos Angicos (UTO 6) (Tabela 4, Figura 3A). Ainda na margem esquerda, as distâncias genéticas das UTO's 3 (Lajedo da Lapa) e 4 (Lajedo do Alfredo) (que é de 3% entre elas) variam de 10,6 a 11,9% quando comparadas às demais UTO's na mesma margem (Tabela 4, Figura 3A), também de maneira independente da distância geográfica e compatível com um padrão vicariante.

Tabela 4. Distâncias genéticas médias (K2P) intraespecíficas (na diagonal, em negrito) e entre as diferentes UTO's identificadas para *K. troglobia*.

	<i>K. troglobia</i>	UTO 1 Lajedo Bonito	UTO 2 Lajedo do Arapua	UTO 3 Lajedo da Lapa	UTO 4 CDS	UTO 5 RUM e BRD	UTO 6 Lajedo dos Angicos
<i>K. troglobia</i>	<b>0,8%</b>						
UTO 1 – Lajedo Bonito	3,4%	<b>0,59%</b>					
UTO 2 – Lajedo do Arapua	4,1%	3,8%	<b>0,62%</b>				
UTO 3 – Lajedo da Lapa	10,6%	11,1%	11,9%	<b>0,16%</b>			
UTO 4 – CDS	10,8%	11,1%	11,8%	3,0%	<b>0</b>		
UTO 5 - RUM e BRD	11,7%	12,1%	12,4%	10,9%	11,3%	<b>0,8%</b>	
UTO 6 – Lajedo dos Angicos	13,9%	14,7%	14,5%	12,2%	12,8%	7,1%	<b>0</b>

### Estruturação genética

As análises de variância molecular (AMOVA) indicam que a distribuição das localidades de acordo com os tributários (microbacias) explica 43,22 % ( $\Phi_{CT} = 0.432$ ,  $p = 0.049$ ) da variação genética do *cox1* observada para *Cirolanidae* sp.1 e 86,67% ( $\Phi_{CT} = 0.867$ ,  $p < 0.0001$ ) para *Potiberaba*. Tendo em vista a distribuição e o pequeno número de localidades para *Cirolanidae* sp.2, a única distribuição possível para realização da AMOVA (em bacias hidrográficas) não apresentou resultado significativo. Não houve resultados significativos para a distribuição das localidades com ocorrência dos táxons aquáticos de acordo com os diferentes afloramentos calcários (Tabela 5).

A AMOVA indicou que, para *Kinnapotiguara*, o rio Apodi Mossoró e seus tributários são barreiras biogeográficas que explicam 80.04% da variação genética observada ( $\Phi_{CT} = 0.8$ ,  $p < 0.0001$ ). No entanto, a distribuição das cavernas de acordo com os afloramentos calcários (lajedos) explica melhor (94,94%) a variação observada ( $\Phi_{CT} = 0.949$ ,  $p < 0.0001$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar quanto da variação genética observada nas sequências do *cox1* de *Cirolanidae* sp.1, *Cirolanidae* sp.2, *Potiberaba* e *K. troglobia* pode ser explicada de acordo com a localização das cavernas em relação aos tributários (microbacias) e em diferentes afloramentos calcários (lajedos). As linhas destacadas correspondem às hipóteses que melhor explicam a variação genética.

Taxon	Hipótese	Entre grupos	Entre populações, dentro dos grupos	Dentro das populações	$\Phi_{CT}$	p
Cirolanidae sp.1	<b>Tributários</b> (ODC+APO / FNV+CLG / PDL / CAG / TRO / CBO+TLG)	43.22	3.67	53.11	0.432	0.049
	<b>Lajedos</b> (APO / ODC / CAG / CBO / TRO / TLG / FNV+CLG / PDL)	46.78	-0.88	54.11	0.468	0.06
Cirolanidae sp.2	<b>Bacias Hidrográficas</b> (PDL / CRO+TLG)	75.77	22.15	2.08	0.758	0.34
<i>Potiberaba</i>	<b>Tributários</b> (ODC / FFA / PDL / ODO / ODF+CAG+PFE / TRO / CRO / ODT+TLG+CBO)	86.67	3.18	10.15	0.867	<0.0001
	<b>Lajedos</b> (TRO+CRO / ODT / TLG / CBO / PFE / ODF / CAG / ODC / PDL / FFA / ODO)	40.32	48.77	10.91	0.40	0.42
<i>Kinnapotiguara troglobia</i>	<b>Tributários</b> (CBO+MOS+LIE+LAI+RAP+URT+CDS / DBT+CRO+TRO+SET+ARA+BOT / BPX+PFE / RUM+BRD / SN9+SUB)	80.04	19.62	0.34	0.800	<0.0001
	<b>Lajedos</b> (TRO+CRO+DBT / CBO+MOS+LIE+LAI+RAP+URT / CDS / SET+ARA+BOT / BPX+PFE / RUM / BRD / SN9+SUB)	94.94	4.61	0.45	0.949	<0.0001

## DISCUSSÃO

### Diversidade de linhagens

Com exceção de *Cirolanidae* sp.1, todos os demais grupos apresentaram extensa diversidade de linhagens evolutivamente distintas. Além da identificação de três UTO's para *Cirolanidae* sp.2 e quatro para *Potiberaba* (além de *P. porakuara*), *Kinnapotiguara* provavelmente consiste em um complexo com outras seis espécies crípticas além de *K. troglobia*. Tais resultados têm suporte nos clados recuperados nas análises filogenéticas, métodos de delimitação de linhagens e distâncias genéticas, bem como são concordantes com as análises de variância molecular (AMOVA).

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 particularmente comum (Verovnik et al., 2003; Finston et al., 2007; Trontelj et al., 2009; Niemiller et al., 2012; 2013). Além da evolução de morfologias semelhantes via evolução convergente, ou paralela, em grupos relacionados (Culver e Pipan, 2009), a estabilidade dos habitats subterrâneos e sua conectividade limitada podem levar a elevados níveis de endemismo (Gibert e Deharveng, 2002; Verovnik et al., 2003; Finston et al., 2007).

Supõe-se que organismos subterrâneos aquáticos têm distribuição mais ampla que os terrestres, devido à sua presumível maior capacidade de dispersão e conectividade de habitat (Barr e Holsinger, 1985; Lamoreux, 2004). No entanto, estudos demonstraram que espécies estigóbias podem ser compostas por várias populações geográficas distribuídas de acordo com os limites hidrográficos em terrenos cársticos (Finston et al., 2007; Trontelj et al., 2009; Niemiller et al., 2012; 2013), e até mesmo consistir em complexos de espécies (Trontelj et al., 2009; Fišer et al., 2018). Como a conectividade hidrológica subterrânea afeta fortemente o fluxo gênico e, portanto, a conectividade entre populações em espécies estigóbias (Venarsky et al., 2009), a existência de diferentes linhagens de *Cirolanidae* sp.2 e *Potiberaba* de acordo com as diferentes microbacias, bem como na drenagem epicárstica da caverna dos Crotos, era esperada.

Além da UTO 2 de *Cirolanidae* sp.2 e da UTO 2 de *Potiberaba*, a drenagem epicárstica na caverna dos Crotos abriga ainda outras espécies exclusivas, tais como uma espécie ainda não descrita de *Oligochaeta* troglóbia, uma de *Calabozoidea* (Isopoda) e a planária *Hausera hauseri* (Tricladida: Dimarcusidae) (Leal-Zanchet et al., 2014; Bento et al., 2021).

Em relação ao ambiente subterrâneo terrestre, diversos estudos moleculares recentes têm procurado explicar as relações filogenéticas e a distribuição de invertebrados cavernícolas como aranhas (Zhang e Shuqiang, 2013; Mammola et al., 2015), escorpiões (Bryson et al., 2014), amblipígeos (Esposito et al., 2015), grilos (Allegrucci et al., 2017), besouros (Gómez et al., 2016) e também cigarrinhas (Wessel et al., 2013). Tais estudos frequentemente identificam padrões de distribuição semelhantes aos encontrados para *Kinnapotiguara*, com linhagens distintas e exclusivas de uma ou poucas cavernas próximas. Além disso, o papel do rio Apodi-Mossoró e seus tributários como barreiras à dispersão de *Kinnapotiguara* corrobora o papel de rios como barreiras para troglóbios terrestres (Barr e Holsinger, 1985). Assim, os resultados aqui encontrados corroboram o padrão de um número desproporcionalmente maior de espécies crípticas alopátricas em regiões altamente fragmentadas (Fišer et al., 2018), o que é

especialmente válido para espécies troglóbias em áreas cársticas (Bickford et al., 2007; Niemiller et al., 2012).

Houve exceções, no entanto, e as distâncias genéticas em *Cirolanidae* sp.1 em toda sua distribuição são compatíveis com uma baixa variabilidade intraespecífica para o COI em Isopoda (0–1,8%, Brix et al., 2011; 0–1,6%, Rodcharoen et al., 2016). Padrão semelhante também ocorre em outras regiões, como na Europa, por exemplo, onde há macroestigobiontes com grandes áreas de distribuição, particularmente entre os isópodes (Henry e Magniez, 2003).

### **Paleoclima**

Embora seja difícil extrair conclusões precisas sobre os eventos que determinaram as divisões entre as diferentes linhagens, em função dos grandes intervalos de confiança em torno das estimativas, os tempos de divergência estão de acordo com eventos paleoclimáticos (Werneck, 2011; Dupont et al., 2013; Herbert et al., 2016; Silva e Souza, 2018) que moldaram as atuais faunas cavernícolas nos trópicos e em todo o mundo (White e Pipan, 2019).

O primeiro grande evento paleoclimático com efeitos no isolamento de linhagens subterrâneas na área de estudo foi a regressão oceânica no final do Mioceno, bem documentada regional e localmente (Rosseti et al., 2013) e correlacionada com o alto nível eustático global (Haq et al., 1987; Haq e Al-Qahtani, 2005). O nível do mar regrediu desde então, sem outros eventos de transgressão de grande escala, até o nível atual (Bezerra et al., 2003; Haq et al., 1987; Haq e Al-Qahtani, 2005). As estimativas apontam que as linhagens mais antigas em *Cirolanidae* sp.2 (7.66 Ma; 2.66-17.73 HPD) e *Potiberaba* (5.88 Ma; 4.10-8.02 HPD) divergiram no final do Mioceno, o que está de acordo com o provável isolamento em função de eventos vicariantes resultantes da regressão oceânica. Transgressões e regressões oceânicas também são apontadas como explicações para a origem e distribuição de muitos táxons subterrâneos em regiões costeiras (Alvarez et al., 2015; Humphreys, 2019; Delic et al., 2020), e a área deste estudo abriga uma comunidade de relictos oceânicos composta por cirolanídeos (Ferreira et al., 2010), anfípodes (Fisř et al., 2013) e planárias (Souza et al., 2018).

Após a diminuição do nível do mar, e consequente regressão oceânica, seguiu-se um período de aridificação nos trópicos em função do resfriamento global no final do Mioceno (Rosseti et al., 2013; Herbert et al., 2016). Enquanto as glaciações são apontadas como as principais responsáveis pelo isolamento de linhagens ancestrais no ambiente subterrâneo, e posterior origem de espécies troglóbias no hemisfério Norte (White e Pipan, 2019), o estabelecimento de climas áridos teve papel semelhante em regiões tropicais como a Austrália (Finston et al., 2007; Guzik et al., 2011; Humphreys, 2019).

Assim como ocorre com *Cirolanidae* sp.2 e algumas UTO's de *Potiberaba*, a maioria das espécies de estigóbios na Austrália têm distribuição restrita a aquíferos ou drenagens individuais, como esperado para táxons confinados a habitats aquáticos subterrâneos e que têm baixa capacidade de dispersão (Humphreys, 2019). Também a exemplo do que ocorre em algumas cavernas na área de estudo, os ambientes subterrâneos em regiões áridas na Austrália abrigam assembleias de troglóbios endêmicas (Guzik et al., 2011; Bradford et al., 2013), e padrões filogeográficos comparáveis entre táxons não relacionados em um sistema ecológico são fortes evidências de uma história espaço-temporal compartilhada (Carstens et al., 2005).

Outro componente importante da intrincada história evolutiva dos grupos-alvos deste estudo é a evolução geológica da formação Jandaíra, cuja exumação tardia vem ocorrendo desde o Mioceno. Com isso, teve início intenso processo de carstificação que, associado ao fraturamento desses calcários e a concentração de zonas de percolação da água meteórica, proporcionou o desenvolvimento de grandes áreas subterrâneas dissolvidas, como dolinas e cavernas (Bagni et al., 2020). A origem e ampliação desses habitats subterrâneos, portanto, ocorreu durante a alternância entre períodos secos e úmidos (de acordo com períodos glaciais e interglaciais) que contribuíram para a expansão das condições semiáridas e para a dispersão e diversificação de organismos adaptados às florestas tropicais sazonalmente secas, como a Caatinga (Werneck, 2011; Dupont et al., 2013; Costa et al., 2018). Assim, a associação entre uma grande disponibilidade de ambientes subterrâneos e condições externas desfavoráveis deve ter tido papel fundamental na diversificação dos artrópodes troglóbios.

As análises aqui apresentadas, no entanto, indicam que *Cirolanidae* sp.1 não apresenta o mesmo padrão encontrado para os demais táxons troglóbios e pode ser considerada uma única espécie amplamente distribuída. Isso poderia ser em parte explicado em razão do maior tamanho corporal de *Cirolanidae* sp.1 (>1cm) em relação a *Cirolanidae* sp.2 (≈5mm) (dados não publicados) e *Potiberaba* (≈ 3.5mm; Fiser et al. 2013), já que a capacidade de dispersão ativa é positivamente relacionada ao tamanho corporal (Jenkins et al., 2007; Shurin et al., 2009). Mais estudos são necessários para explicar se tal condição pode ser resultante de uma maior capacidade de dispersão e/ou uma menor especificidade ecológica, permitindo a dispersão (e/ou colonização) por aquíferos não acessíveis aos outros táxons e a manutenção de fluxo gênico entre as diferentes localidades, mesmo que somente durante os períodos mais úmidos (Wang et al., 2004; Silva e Souza, 2018).

Dois pontos relacionados aos resultados envolvendo *Kinnapotiguara* merecem destaque. A primeira envolve as estimativas para divergência das linhagens com base na taxa

mitocondrial padrão para insetos (2.3%/Ma, ou 0.0115 subst./site/Ma), e Wessel et al. (2013) relatam que taxas de mutação muito mais rápidas devem ter ocorrido em um complexo de espécies de cigarrinhas troglóbias que vivem em tubos de lava no Havaí (cuja evolução geológica do terreno é muito mais rápida do que em paisagens cársticas). Uma estimativa confiável da idade do rio Apodi-Mossoró (provavelmente responsável pela principal divergência, aqui estimada há 6.14 Ma [4.2-8.46 HPD]), poderia indicar uma taxa de mutação mais adequada para *Kinnapotiguara*, no entanto, taxas muito elevadas não são compatíveis com as estimativas atuais para a idade da falha geológica que deu origem à calha do rio - entre o Mioceno e o Quaternário (Bagni et al., 2020).

O segundo ponto está relacionado à principal divergência entre as linhagens de *Kinnapotiguara* da margem esquerda do Rio Apodi-Mossoró, que teria ocorrido há cerca de 6.72 Ma [5.01-8.35 HPD]. Tal divergência estaria relacionada ao Riacho do Abreu, e deu origem às UTO's 3 (Lajedo da Lapa) e 4 (Lajedo do Alfredo), na margem direita da drenagem, e às demais linhagens à esquerda desse riacho (*K. troglobia* e as UTO 1 - Lajedo Bonito, e UTO 2 - Lajedo do Arapuá). As distâncias genéticas entre as UTO's nestas duas linhagens (3% entre a UTO 3 e UTO 4; entre 3,4% e 4,1% entre *K. troglobia*, UTO 1 e UTO 2) não variam de acordo com as distâncias geográficas e são compatíveis com um padrão vicariante.

### **Identificação de UTO's**

O conceito de que espécies são linhagens de populações ou metapopulações evoluindo separadamente tem sido cada vez mais usado (Padiál et al., 2010). Assim, espécies poderiam ser delimitadas usando os critérios de isolamento genético (Fisër et al., 2018). Além da aplicação de uma ampla gama de análises de delimitação aos táxons-alvo, optamos por uma abordagem conservadora na delimitação de linhagens, definidas a partir da concordância entre a maioria dos métodos e a distribuição geográfica (Carstens et al., 2013).

Embora o uso cada vez maior de métodos de delimitação possa levar à descoberta genuína de linhagens evolutivas anteriormente desconhecidas, é necessária cautela. Pequenas populações recentemente isoladas, por deriva genética, já poderiam se tornar reciprocamente monofiléticas e ser diagnosticáveis (Padiál et al., 2010). Dessa forma, delimitar espécies associadas a sistemas naturalmente fragmentados e alopátricos, tais como cavernas, onde pressões seletivas semelhantes podem promover estase morfológica ou homoplasia, permanece uma tarefa desafiadora (Bickford et al., 2007; Niemiller et al., 2012).

Assim, inferências sobre os limites de espécies com base apenas em dados genéticos devem ser consideradas hipóteses. A delimitação deve ser conduzida levando-se em

consideração outras fontes de informação, tais como a história de vida, distribuição geográfica, morfologia, comportamento, entre outras. Isso constitui a chamada taxonomia integrativa (de Queiroz, 2007; Padial et al., 2010; Sukumaran e Knowles, 2017).

Análises que incluem uma estimativa da diversidade de espécies a partir de linhagens hipotéticas (mesmo que usando um único locus gênico), além de informações sobre distribuição, constituem um importante ponto de partida para a realização de pesquisas futuras, especialmente para grupos pouco estudados e de ambientes extremos como habitats subterrâneos (Fisř e Zagamjster, 2009; Carstens et al., 2013). Além disso, diversos estudos têm encontrado correspondência entre linhagens crípticas identificadas a partir de DNA mitocondrial (geralmente um único marcador, o *cox1*) e agrupamentos delimitados a partir de marcadores nucleares, incluindo dados genômicos. Entre os Arthropoda, alguns desses estudos envolveram insetos (Janzen et al., 2017; Kozlov et al., 2017; Dincă et al., 2019), além de Isópodes (Guzik et al., 2019) e anfípodes estigóbios (Zakřek et al., 2019).

Além dos dados genéticos, nossas análises basearam-se na distribuição geográfica e história evolutiva para explicar o isolamento das linhagens. Com amostragem em toda a distribuição conhecida dos táxons-alvo, identificamos que as microbacias são determinantes para a diferenciação das linhagens nos táxons aquáticos que apresentaram diversidade críptica (*Cirolanidae* sp.2 e *Potiberaba*) e também para *Kinnapotiguara*, sendo que, nesse caso, os lajedos determinaram uma estruturação ainda maior. Outras barreiras, possivelmente relacionadas à capacidade de dispersão e/ou especificidades ecológicas, aqui não identificadas, devem explicar as diferenças observadas entre *Cirolanidae* sp.1 e os demais táxons aquáticos. Assim, as UTO's aqui delimitadas são apresentadas como hipóteses de espécies e é recomendada a realização de novos estudos objetivando testá-las e, sendo confirmadas, descrevê-las formalmente com base em uma abordagem de taxonomia integrativa.

Adicionalmente, somente uma pequena parcela das linhagens aqui identificadas encontra-se oficialmente protegidas no PARNA da Furna Feia (parte da distribuição de *Cirolanidae* sp.1, a UTO 1 de *Cirolanidae* sp.2 e as UTO's 1 e 3 de *Potiberaba*). A maioria das demais linhagens está em áreas expostas a diversas atividades antrópicas impactantes, tais como turismo desordenado, mineração, exploração de petróleo, desmatamento e exploração insustentável de água subterrânea para fruticultura irrigada (Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010). Assim, ações urgentes de controle, planejamento e educação ambiental são necessárias visando à conservação das demais linhagens aqui identificadas, a maioria com distribuição restrita e possivelmente ameaçadas de extinção.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A filogeografia comparada pode revelar informações rápidas e robustas para acessar grupos sem taxonomistas especialistas, ou no caso de pouca divergência morfológica. Além disso, pode contribuir para a taxonomia ao indicar os principais agrupamentos dentro de cada táxon. Essas informações iniciais podem ser valiosas no caso de grupos pouco conhecidos e endêmicos, principalmente ao chamar atenção para linhagens possivelmente ameaçadas de extinção e de interesse para conservação.

Recomenda-se a realização de pesquisas adicionais com a inclusão de outros marcadores moleculares, além de outras visando acessar informações ecológicas e de história de vida. Tais informações, associadas à formação de especialistas nesses táxons, são necessárias para compreender adequadamente os padrões aqui identificados e traçar estratégias efetivas de conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allegrucci G, Minasi GM, Sbordoni V (1997) Patterns of gene flows and genetic structure in cave-dwelling crickets of the Tuscan endemic, *Dolichopoda schiavazzii* (Orthoptera, Raphiidophoridae). **Heredity** 78:665-673.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6):711–728.
- Alvarez F, Iliffe TM, Benitez S, Brankovits D, Villalobos JL (2015) New records of anchialine fauna from the Yucatan Peninsula. **Mexico Check List** 11(1): 1505. <https://doi.org/10.15560/11.1.1505>.
- Bagni FL, Bezerra FH, Balsamo F, Maia RP, & Dall'Aglio M (2020) Karst dissolution along fracture corridors in an anticline hinge, Jandaíra Formation, Brazil: Implications for reservoir quality. **Marine and Petroleum Geology** 115, 104249. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2020.104249>.
- Barr TC, Holsinger JR (1985) Speciation in cave faunas. **Annu Rev Ecol Syst** 16:313–337.
- 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. **Biodiversity and Conservation**. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>.
- Bezerra FHR, Barreto AMF, Suguio K (2003) Holocene sea-level history on the Rio Grande do Norte State coast, Brazil. **Marine Geology** 196: 73-89.
- Bezerra FHR, Takeya MK, Sousa MOL, Nascimento AF (2007) Coseismic reactivation of the Samambaia fault, Brazil. **Tectonophysics** 430: 27–39.
- 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.
- 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 Computational Biology**, 15(4), e1006650.
- Brasil. Decreto de 5 de junho de 2012. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional da Fuma Feia, nos municípios de Baraúna e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jun. 2012.
- Bradford TM, Adams M, Guzik MT, Humphreys WF, Austin AD, & Cooper SJ (2013) Patterns of population genetic variation in sympatric chiltoniid amphipods within a calcrete aquifer reveal a dynamic subterranean environment. **Heredity** 111(1): 77-85.
- Brix S, Riehl T, Leese F (2011) First genetic data for species of the genus *Haploniscus* Richardson, 1908 (Isopoda: Asellota: Haploniscidae) from neighbouring deep-sea basins in the South Atlantic. **Zootaxa** 2838:79–84.
- Bryson RW, Prendini L, Savary WE, Pearman PB (2014) Caves as microrefugia: Pleistocene phylogeography of the troglomorphic North American scorpion *Pseudouroctonus reddelli*. **BMC Evolutionary Biology** 14: 9. doi:10.1186/1471-2148-14-9.

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

Carstens BC, Brunsfeld SJ, Demboski JR, Good JM, Sullivan J (2005) Investigating the evolutionary history of the Pacific Northwest mesic forest ecosystem: hypothesis testing within a comparative phylogeographic framework. **Evolution** 59: 1639–1652.

Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Salter JD (2013) How to fail at species delimitation. **Mol. Ecol.** 22: 4369–4383.

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.

Culver DC, Pipan T (2009) **The biology of caves and other subterranean habitats**. Library of Congress Cataloging in Publication Data, Oxford University Press, Oxford.

Culver DC, Pipan T, Schneider K (2009) Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. **Freshwater Biology** 54: 918–929.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8): 772-772.

de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. **Syst. Biol.** 56: 879–886.

Delić T, Stoch F, Borko Š, Flot JF, Fišer C (2020) How did subterranean amphipods cross the Adriatic Sea? Phylogenetic evidence for dispersal–vicariance interplay mediated by marine regression–transgression cycles. **Journal of Biogeography** 47(9): 1875-1887.

Dincă V, Wiklund C, Lukhtanov VA, Kodandaramaiah U, Norén K, Dapporto L, ... & Friberg M (2013) Reproductive isolation and patterns of genetic differentiation in a cryptic butterfly species complex. **Journal of Evolutionary Biology** 26(10): 2095-2106. <https://doi.org/10.1111/jeb.12211>.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution** 29(8): 1969-1973.

Dupont LM, Rommerskirchen F, Mollenhauer G, Schefuß E (2013) Miocene to Pliocene changes in South African hydrology and vegetation in relation to the expansion of C4 plants. **Earth and Planetary Science Letters** 375: 408-417.

Esposito LA, Bloom T, Caicedo-Quiroga L, Alicea-Serrano A M, Sánchez-Ruiz JA, May-Collado LJ, ... & Agnarsson I (2015) Islands within islands: diversification of tailless whip spiders (*Amblypygi*, *Phrynus*) in Caribbean caves. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 93: 107-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.005>.

Excoffier L, Lischer HL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10(3): 564-567.

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** 01:25-51.

- 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, Zagamajster M (2009) Cryptic species from cryptic space: the case of *Niphargus fongi* sp. n. (Amphipoda, Niphargidae). **Crustaceana** 82: 593-614.
- Fišer, C.; Zagamajster, M.; Ferreira, R.L. (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.
- Flouri T, Jiao X, Rannala B, & Yang Z (2018) Species tree inference with BPP using genomic sequences and the multispecies coalescent. **Molecular Biology and Evolution** 35(10): 2585-2593.
- 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): 294-9.
- Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology** 62(5): 707-724.
- Gibert J, Deharveng L (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity: **Bioscience** 52: 473–481.
- Gómez RA, Reddell J, Will K, Moore W (2016) Up high and down low: Molecular systematics and insight into the diversification of the ground beetle genus *Rhadine* LeConte. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 98: 161-175.
- Guzik MT, Cooper SJB, Humphreys WF, Ong S, Kawakami T, & Austin AD (2011) Evidence for population fragmentation within a subterranean aquatic habitat in the Western Australian desert. **Heredity** 107(3): 215-230.
- Guzik MT, Stringer DN, Murphy NP, Cooper SJ, Taiti S, King RA, ... & Austin AD (2019) Molecular phylogenetic analysis of Australian arid-zone oniscidean isopods (Crustacea: Haloniscus) reveals strong regional endemism and new putative species. **Invertebrate Systematics** 33(3): 556-574. <https://doi.org/10.1071/IS18070>.
- Hancock ZB, Hardin FO, & Light JE (2019) Phylogeography of sand-burrowing amphipods (Haustoriidae) supports an ancient suture zone in the Gulf of Mexico. **Journal of Biogeography** 46(11): 2532-2547.
- Haq BU, Hardenbol J, Vail PR (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. **Science** 235:1156–1167.
- Haq BU, Al-Qahtani AM (2005) Phanerozoic cycles of sea-level change on the Arabian Platform. **GeoArabia** 10:127–160.
- Henry JP, & Magniez G (2003) Isopodes aselloïdes stygobies d'Espagne, III—Le genre *Proasellus*: B—espèces anophtalmes. **Beaufortia** 53(6): 129-157.

- Herbert TD, Lawrence KT, Tzanova A, Peterson LC, Caballero-Gill R, & Kelly CS (2016) Late Miocene global cooling and the rise of modern ecosystems. **Nature Geoscience** 9(11): 843–847.
- Hoch H, Ferreira RL (2013) *Potiguara troglobia* gen. n., sp. n.—first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). **Dtsch Entomol Z** 60(1)33–40.
- 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.
- Humphreys WF (2019) Biodiversity patterns in Australia. 109-126. In: White WB and Culver DC (eds), **Encyclopedia of Caves**, 3rd Edition. Academic Press, San Diego.
- Janzen DH, Burns JM, Cong Q, Hallwachs W, Dapkey T, Manjunath R, ... Grishin NV (2017) Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 114(31): 8313–8318. doi:10.1073/pnas.1621504114.
- Jenkins DG, Brescacin CR, Duxbury CV, Elliott JA, Evans JA, Grablow KR et al. (2007) Does size matter for dispersal distance? **Glob. Ecol. Biogeogr.** 16: 415–425.
- Juan C, Guzik MT, Jaume D, Cooper SJB (2010) Evolution in caves: Darwin’s ‘wrecks of ancient life’ in the molecular era. **Molecular Ecology** 19:3865-3880.
- Kozlov MV, Mutanen M, Lee KM, and Huemer P (2017) Cryptic diversity in the long-horn moth *Nemophora degeerella* (Lepidoptera: Adelidae) revealed by morphology, DNA barcodes and genome-wide ddRAD-seq data. **Syst. Entomol.** 42: 329–346. doi: 10.1111/syen.12216.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, & Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35(6): 1547-1549.
- Lamoreux J (2004) Stygobites are more wide-ranging than troglobites. **J Cave Karst Stud** 66:8–19.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25(11): 1451-1452.
- Maia RP, Sousa MOL, Bezerra FHR, Xavier Neto P, de Moura Lima EN, Silva CCN & Santos RD (2012) A importância do controle tectônico para a formação da paisagem cárstica na Bacia Potiguar, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Geomorfologia** 13(4).
- 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, Jones A, Barberis M, Badino G, & Isaia M (2016) Ecology and sampling techniques of an understudied subterranean habitat: the Milieu Souterrain Superficiel (MSS). **The Science of Nature** 103(11-12), 88.
- Mammola S, Chiappetta N, Giachino PM, Antić DŽ, Zapparoli M, Isaia M (2020) Exploring the homogeneity of terrestrial subterranean communities at a local spatial scale. **Ecological Entomology**, DOI: 10.1111/een.12883.

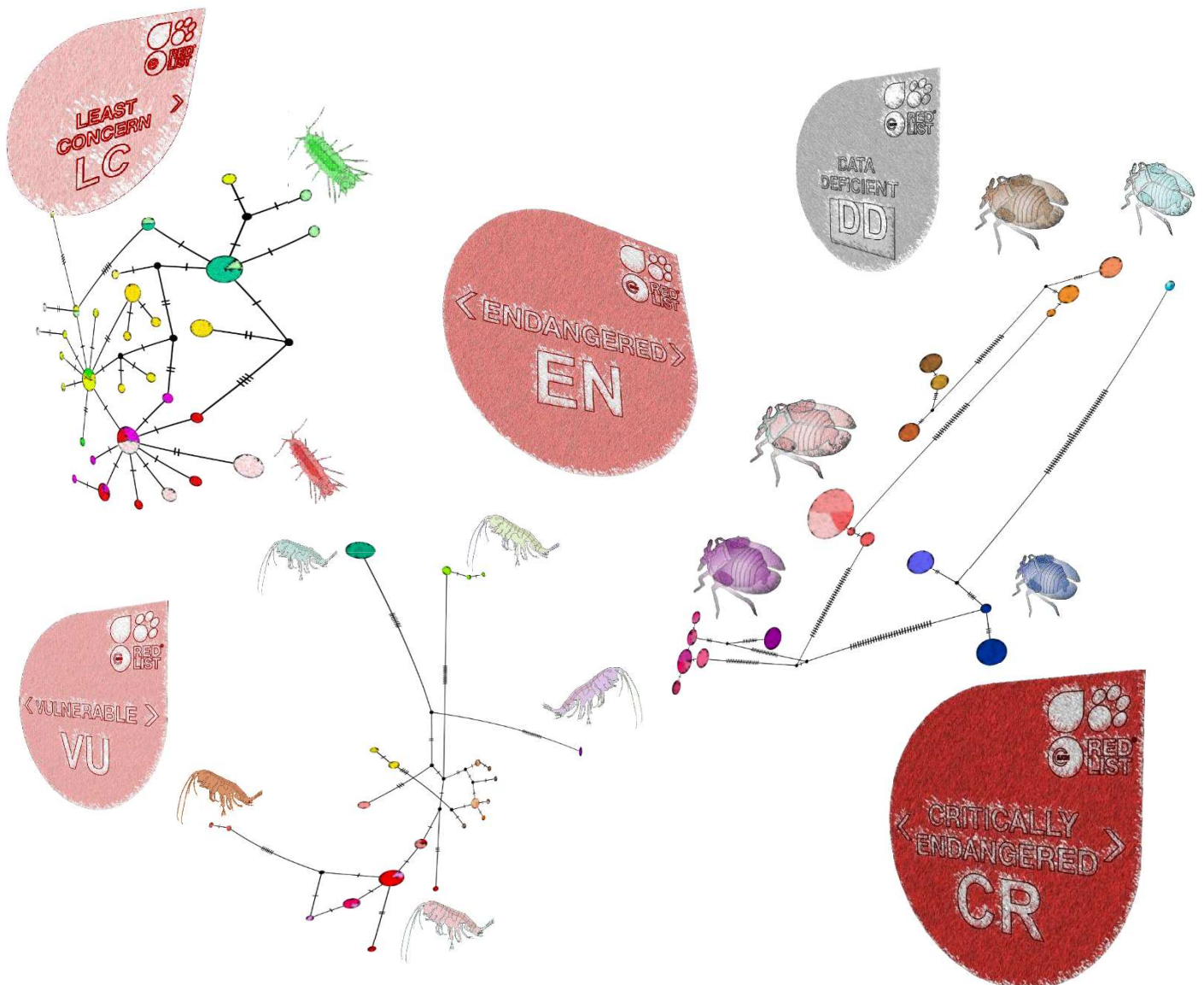
- Niemiller ML, Near TJ, Fitzpatrick BM (2012) Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). **Evolution** 66:846–866.
- Niemiller ML, Graening GO, Fenolio DB, Godwin JC, Cooley JR, Pearson WD, ... & 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.
- Padial JM, Miralles A, la Riva De I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. **Front. Zool.** 7, 16.
- Pipán 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.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, & Achaz G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology** 21(8): 1864-1877.
- Rabelo JG, Maia RP, Bezerra FHR, Silva CCN (2020) Karstification and fluid flow in carbonate units controlled by propagation and linkage of mesoscale fractures, Jandaíra Formation, Brazil. **Geomorphology** 357, 107090. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2020.107090>.
- Rodcharoen E, Bruce NL, & Pholpunthin P (2016) Description of four new species of the *Cirolana* ‘parva group’ (Crustacea: Isopoda: Cirolanidae) from Thailand, with supporting molecular (COI) data. **Journal of Natural History** 50(31-32): 1935-1981.
- Rosseti DF, Bezerra FHR, Dominguez JML (2013) Late Oligocene–Miocene transgressions along the equatorial and eastern margins of Brazil. **Earth-Science Reviews** 123:87-112.
- Shurin JB, Cottenie K & Hillebrand H (2009) Spatial autocorrelation and dispersal limitation in freshwater organisms. **Oecologia** 159: 151–159.
- Silva JMC, Leal I, Tabarelli M (2017) **Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America**, first ed. Springer, New York.
- Silva AC, Souza AF (2018) Aridity drives plant biogeographical sub regions in the Caatinga, the largest tropical dry forest and woodland block in South America. **PloS One** 13(4), e0196130.
- 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.
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics** 30(9):1312-3.
- Sukumaran J, Knowles LL (2017) Multispecies coalescent delimits structure, not species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 114: 1607–1612.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- Trontelj P, Douady CJ, Fiser C, Gibert J, Goricki S, LeFebure T, Sket B, Zaksček V (2009) A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macrostygobionts? **Freshw Biol** 54:727–744.

- Venarsky MP, Anderson FE, Wilhelm FM (2009) Population genetic study of the U.S. federally listed Illinois cave amphipod, *Gammarus acherondytes*. **Conservation Genetics** 10: 915-921.
- 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.
- Wang X et al. (2004) Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. **Nature** 432: 740-743.
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews** 30(13-14): 1630–1648.
- Wessel A, Hoch H, Asche M, von Rintelen T, Stelbrink B, Heck V, ... & Howarth FG (2013) Founder effects initiated rapid species radiation in Hawaiian cave planthoppers. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110(23): 9391-9396.
- White WB, Culver DC, Pipan, T (2019) **Encyclopedia of caves**, 3rd edn. Academic press.
- Xia X (2018) DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution** 35(6): 1550-1552.
- Yoshino H, Yamaji F, Ohsawa TA (2018) Genetic structure and dispersal patterns in *Limnoria nagatai* (Limnoriidae, Isopoda) dwelling in non-buoyant kelps, *Eisenia bicyclis* and *E. arborea*, in Japan. **PLoS ONE** 13(6): e0198451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198451>.
- Zakšek V, Delić T, Fišer C, Jalžić B, & Trontelj P (2019) Emergence of sympatry in a radiation of subterranean amphipods. **Journal of Biogeography** 46(3): 657-669. doi:10.1111/jbi.13514.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, & Stamatakis A (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, 29, 2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>.

# CAPÍTULO II

**Antes que seja tarde:  
áreas prioritárias para conservação de  
espécies crípticas e ameaçadas de  
artrópodos troglóbios na Caatinga**

*Before it is too late:  
priority areas for conservation of cryptic and  
threatened species of cave arthropods in  
Brazilian semiarid*



## **Antes que seja tarde: áreas prioritárias para conservação de espécies crípticas e ameaçadas de artrópodes troglóbios na Caatinga.**

### **RESUMO**

A avaliação precisa da riqueza de espécies e endemismos é essencial para identificar áreas prioritárias para conservação. Uma das etapas mais importantes nesse processo é a avaliação do risco de extinção, que depende da compreensão da distribuição geográfica e/ou dinâmica populacional das espécies e das ameaças às quais estão submetidas. Enquanto a maioria das espécies permanece não descrita, a identificação de linhagens crípticas é um resultado frequente em estudos filogenéticos e filogeográficos, sendo comum em organismos subterrâneos. O oeste da formação Jandaíra, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, Nordeste do Brasil, é uma área com grande relevância bioespeleológica onde foi identificada grande diversidade de linhagens crípticas em três de quatro táxons troglóbios anteriormente considerados de ampla distribuição (isópodes e anfípodes aquáticos, além de uma cigarrinha terrestre). É possível que tais linhagens estejam diferencialmente expostas a ameaças antrópicas, e que possuam diferentes riscos de extinção em relação aos táxons nominiais dos quais fazem parte. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o estado de conservação de cada uma das linhagens e identificar áreas prioritárias para sua conservação. Foram identificadas sete ameaças antrópicas que impactam as linhagens crípticas, que por sua vez podem ser enquadradas em diferentes categorias de ameaça em relação aos complexos de espécies dos quais fazem parte. Enquanto *Cirolanidae* sp.1 foi categorizada como Vulnerável, *Cirolanidae* sp.2 possui uma linhagem Menos Preocupante (LC) e duas Criticamente Ameaçadas (CR). Em *Potiberaba*, há duas linhagens LC, uma Em Perigo (EN, *P. porakuara*) e duas CR. Por fim, para *Kinnapotiguara*, há quatro linhagens EN e três CR (incluindo *K. troglobia*). Foram identificadas duas áreas prioritárias para conservação das 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 uso de abordagem filogeográfica comparada pode representar um primeiro passo no processo de garantir a proteção de táxons subterrâneos, indicando áreas e ações que devem ser priorizadas em um contexto de recursos cada vez mais escassos para a conservação.

**Palavras Chave:** Estado de conservação, Cavernas, Cox1, Espécies ameaçadas, Filogeografia, IUCN.

*Before it is too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of cave arthropods in Brazilian semiarid*

**ABSTRACT**

Accurate assessment of species richness and endemism is essential to identify priority areas for conservation. One of the most important steps in this process is the assessment of extinction risk, which depends on understanding the geographic distribution and/or population dynamics of the species and the threats to which they are submitted. While most species remain undescribed, the identification of cryptic lineages is frequent in phylogenetic and phylogeographic studies, being particularly common in subterranean organisms. The west of the Jandaíra Formation, in the states of Rio Grande do Norte and Ceará, Northeast Brazil, is an area of great biospeleological relevance where a great diversity of cryptic lineages has been identified in three of four troglobitic taxa previously considered to be widely distributed (isopods, amphipods and a terrestrial planthopper). It is possible that such lineages are differentially exposed to anthropogenic threats, and that they have different extinction risks in relation to the nominal taxa to which they are part. Thus, the objectives of this study were to assess the conservation status of each lineage and identify priority areas for its conservation. Seven anthropogenic threats were identified that impact the cryptic lineages, which in turn can be classified into different threat categories in relation to the species complexes they are part. While *Cirolanidae* sp.1 was categorized as Vulnerable, *Cirolanidae* sp.2 has a Least Concern (LC) and two Critically Endangered (CR) lineages. In *Potiberaba*, there are two LC lineages, one Endangered (EN, *P. porakuara*) and two CR. Finally, for *Kinnapotiguara*, there are four EN and three CR lineages (including *K. troglobia*). Two priority areas were identified for the conservation of the lineages, with emphasis on the microbasin region of the Abreu stream and Rosário outcrop, in Felipe Guerra municipality, which houses half (eight, six of which are endemic) of the identified lineages. The use of a comparative phylogeographic approach can represent a first step in the process of guaranteeing the protection of subterranean taxa, indicating areas and actions that should be prioritized in a context of increasingly scarce resources for conservation.

**Keywords:** Conservation status, Caves, Cox1, Endangered species, IUCN, Phylogeography.

## INTRODUÇÃO

As crescentes ameaças à biodiversidade em função da ação humana, em todo o mundo, tornam necessárias ações de conservação baseadas em padrões evolutivos para preservar populações e espécies de animais e plantas ameaçadas (Carroll et al., 2014; Smith et al., 2014; Nielsen et al., 2017). Nesse contexto, prevenir a perda de habitat é talvez o maior desafio para a conservação da biodiversidade global, sendo que avaliações precisas da riqueza de espécies e endemismos são essenciais para identificar áreas prioritárias para conservação e orientar a delimitação de áreas protegidas (Myers et al., 2000; Bickford et al., 2007; Beheregaray e Caccione, 2007; Bernardo, 2011; Funk et al., 2012). Uma das etapas mais importantes nesse processo envolve a avaliação do estado de conservação de espécies, que, por sua vez, depende da compreensão da distribuição geográfica e/ou dinâmica populacional das espécies, além das ameaças (reais e potenciais) às quais estão submetidas (Souza et al., 2018; IUCN, 2019).

A maioria das espécies, no entanto, permanece não descrita, de forma que esforços para catalogar e compreender a biodiversidade precisam ser priorizados (Bickford et al., 2007). Mesmo considerando somente as espécies formalmente reconhecidas, a maioria delas foi descrita com base no conceito fenético ou morfológico (Mayden, 1997). Entretanto, a especiação nem sempre é acompanhada por mudanças morfológicas suficientemente marcantes para diferenciar linhagens distintas, de forma que a identificação e descrição de espécies crípticas têm implicações importantes para a conservação, proteção e gestão dos recursos naturais (Bickford et al., 2007). Tais espécies são constituídas frequentemente por pequenas populações ou linhagens alopátricas que podem estar em maior risco de extinção, já que a genética e a biologia evolutiva não estão, na maioria das vezes, bem integradas ao planejamento de ações de conservação (Ralls et al., 2018).

Nesse sentido, a identificação de linhagens crípticas tem importantes implicações para a conservação, já que frequentemente apresentam diferentes níveis de ameaça e exigem diferentes estratégias de proteção (Niemiller et al., 2013). Uma espécie anteriormente considerada de ampla distribuição e baixa preocupação para a conservação pode, na verdade, ser constituída de várias espécies crípticas com distribuição restrita e maior risco de extinção (Bickford et al., 2007; Funk et al., 2012; Niemiller et al., 2012; 2013). A descoberta de padrões geográficos e de habitat específicos para a distribuição de espécies crípticas pode, portanto, revelar *hotspots* de endemismo e diversidade ainda desconhecidos que, por sua vez, justificariam a priorização de determinados habitats ou locais para conservação (Bickford et al., 2007).

A identificação de linhagens crípticas é um resultado frequente em estudos filogenéticos e filogeográficos, sendo especialmente comum em organismos subterrâneos (Verovnik et al., 2003; Finston et al., 2007; Trontelj et al., 2009; Niemiller et al., 2012; 2013; Fišer et al., 2018). Apesar de os habitats subterrâneos serem frequentemente negligenciados em questões globais de conservação, eles abrigam formas de vida excepcionais e representam ambientes críticos a serem priorizados nas políticas de conservação (Mammola et al., 2019).

Embora os estudos em biologia subterrânea tenham historicamente se concentrado nas regiões temperadas, principalmente Europa e Estados Unidos, regiões tropicais como Austrália e Brasil têm revelado uma elevada riqueza e inúmeros endemismos de espécies troglóbias (estritamente subterrâneas) (White et al., 2019). No Nordeste do Brasil há extensas áreas cársticas associadas aos calcários da formação Jandaíra, cujos afloramentos intensamente carstificados (conhecidos como lajedos) ocorrem em uma área de mais de 13.000 km<sup>2</sup> no norte do Rio Grande do Norte e nordeste do Ceará (Bezerra et al., 2007; Cruz et al., 2010; CANIE/CECAV, 2020; Rabelo et al., 2020).

A região oeste dessa formação é reconhecida pela riqueza e concentração de espécies de invertebrados troglóbios, no entanto, enquanto a maioria das espécies apresenta distribuição restrita, quatro táxons têm ocorrência relativamente ampla: i) duas espécies de isópodes cirolanídeos, ainda não descritas (Ferreira et al., 2010; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021); ii) o anfípode *Potiberaba* Fišer, Zagmajster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Mesogammaridae) (Ferreira et al., 2010; Fišer et al., 2013; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021); e iii) a cigarrinha troglóbia *Kinnapotiguara troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 (Hemiptera: Kinnaridae) (Ferreira et al., 2010; Hoch e Ferreira, 2013; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021).

No Capítulo I foi identificado que, com exceção de Cirolanidae sp.1, todos os demais táxons amplamente distribuídos apresentaram extensa diversidade de linhagens crípticas. Além da identificação de três unidades taxonômicas operacionais (UTO's) para Cirolanidae sp.2 e quatro para *Potiberaba* (além de *P. porakuara*), *Kinnapotiguara* provavelmente consiste em um complexo com sete espécies crípticas. Além disso, foi identificado que as microbacias são determinantes para a diferenciação das linhagens nos táxons aquáticos que apresentaram diversidade críptica (Cirolanidae sp.2 e *Potiberaba*) e também para *Kinnapotiguara*, sendo que, nesse caso, os lajedos determinaram uma estruturação ainda maior.

Somente uma pequena parcela das linhagens identificadas encontra-se oficialmente protegida no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF), unidade de conservação criada recentemente para proteger uma importante concentração de cavernas entre os municípios de

Baraúna e Mossoró (Brasil, 2012). A maioria das demais linhagens está em cavernas e nascentes cársticas em áreas expostas a diversas atividades antrópicas impactantes, tais como turismo desordenado, mineração, exploração de petróleo, desmatamento e exploração insustentável de água subterrânea para fruticultura irrigada (Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010). É importante destacar que nenhum desses táxons teve seu estado de conservação avaliado.

A incidência e abrangência dessas ameaças variam ao longo da distribuição geográfica desses táxons. Assim, as linhagens crípticas recém identificadas provavelmente estão diferencialmente expostas às ameaças, podendo ser enquadradas em diferentes categorias em relação aos complexos de espécies dos quais fazem parte. Dadas as crescentes ameaças antrópicas que afetam os ambientes que abrigam esses artrópodes troglóbios, uma avaliação do estado de conservação dessas linhagens crípticas se mostra urgente.

Embora áreas com espécies raras e endêmicas sejam frequentemente consideradas no processo de priorização para a conservação da biodiversidade, nem todas têm a mesma importância para a conservação. Por exemplo, áreas que abrigam mais espécies ameaçadas devem ser consideradas mais importantes do que aquelas com espécies de menor preocupação para a conservação (Possingham e Wilson, 2005; Fattorini, 2006; Fattorini et al., 2020). Além disso, vários estudos têm mostrado que a diversidade genética intraespecífica é espacialmente estruturada, e que as áreas de maior diversidade genética são frequentemente coincidentes entre várias espécies (Hewitt, 1996), resultando em *hotspots* de diversidade genética (Carnaval et al., 2014). Apesar disso, ainda há poucos estudos que incorporaram explicitamente a filogeografia de várias espécies na priorização espacial de conservação (Carvalho et al., 2017).

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o estado de conservação dos complexos de espécies e de cada uma das linhagens identificadas no Capítulo I para *Cirolanidae* sp.1, *Cirolanidae* sp.2, *Potiberaba* e *Kinnapotiguara*, bem como identificar áreas prioritárias para ações de conservação dessas linhagens. Para tanto, buscamos: (1) analisar a estruturação e diversidade genética dos táxons-alvo; (2) verificar as ameaças e fatores associados ao risco de extinção; (3) aplicar o método de categorias e critérios da International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Souza et al., 2018; IUCN, 2019) para cada linhagem, fazendo recomendações para a avaliação oficial do estado de conservação; e (4) identificar áreas prioritárias para ações de conservação das linhagens crípticas, mesmo antes de formalmente descritas, no intuito de agilizar a adoção de estratégias de conservação e manejo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de Estudo**

Os táxons-alvos deste estudo ocorrem em 30 cavernas e nascentes cársticas na formação Jandaíra, localizadas nos municípios de Baraúna, Felipe Guerra, Governador Dix-Sept Rosado (GDS Rosado) e Mossoró, estado do Rio Grande do Norte (RN), e Quixeré, Estado do Ceará (CE), Nordeste do Brasil (Tabela 1, Figura 1). Como mencionado anteriormente, somente quatro cavernas estão inseridas no Parque Nacional da Fuma Feia (PNFF), enquanto as demais áreas estão expostas a diversas atividades antrópicas impactantes (Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010).

A região insere-se na Caatinga e apresenta clima quente e semiárido, predominantemente do tipo BSh segundo a classificação climática de Köppen (Alvares et al., 2013). A precipitação média anual situa-se em torno de 800mm (no entanto 70% da precipitação pode ocorrer em um único mês), fato que, aliado à alta incidência solar e à baixa umidade relativa, leva a altas taxas de evaporação e déficit hídrico na maior parte do ano (Silva et al., 2017).

Tabela 1. Dados das cavernas e nascentes com espécies troglóbias alvo deste estudo, incluindo quantidade de indivíduos sequenciados e ameaças (incidentes e potenciais) para cada UTO identificada. A primeira coluna indica os números pelos quais são identificadas as localidades na Figura 1. \* - Parque Nacional da Furna Feia; *P.por* – *Potiberaba* porakuara; *K.tro* – *Kinnapotiguara troglobia*; Ameaças: D – desmatamento, A - agricultura, MI - mineração irregular, EP - exploração de petróleo, P - Pecúria, VD - visitação desordenada, RF - rebaixamento do nível freático, ANM - polígonos de direitos minerários em estágio avançado, DRL: Direito de Requerimento de Lavra, RL: Requerimento de Lavra, CL: Concessão de Lavra.

Localidade	Sigla	Município/Estado	Coordenadas (SIRGAS 2000)		Ocorrência e número de indivíduos sequenciados				Ameaças		
			Latitude (S)	Longitude (W)	Cirolanidae sp.1	Cirolanidae sp.2	<i>Potiberaba</i>	<i>Kinnapotiguara</i>	Incidentes	Potenciais	
01	Furna Nova*	FNV	Baraúna/RN	05° 02' 03,21"	37° 34' 16,04"	7				-	-
02	Caverna do Lago*	LGO	Baraúna/RN	05° 02' 11,40"	37° 34' 15,24"	5				-	-
03	Furna Feia*	FFA	Baraúna/RN	05° 02' 12,76"	37° 33' 36,64"			11 (UTO 1)		-	-
04	Caverna Pedra Lisa*	PDL	Baraúna/RN	05° 02' 43,84"	37° 31' 18,85"	1	5 (UTO 1)	5 (UTO 2)		-	-
05	Gruta do Olho d'Água do Cedro	ODC	Quixeré/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	2		3 ( <i>P.por</i> )		D, A	ANM (CL)
06	Caverna da Aposta	APO	Quixeré/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	2				D, MI	ANM (RL)
07	Olho d'Água da Onça	ODO	Mossoró/RN	05° 28' 34,18"	37° 16' 48,73"			5 (UTO 4)		D, P	ANM (RL)
08	Olho d'Água da Furna	ODF	GDS Rosado/RN	05° 28' 50,55"	37° 32' 29,94"			7 ( <i>P.por</i> )		D, MI, VD	ANM (CL)
09	Gruta Boca de Peixe	BPX	GDS Rosado/RN	05° 29' 04,56"	37° 33' 29,69"				8 (UTO 1)	D, MI	ANM (DRL)
10	Gruta do Poço Feio	PFE	GDS Rosado/RN	05° 29' 15,51"	37° 33' 33,40"			4 ( <i>P.por</i> )	8 (UTO 1)	D, MI, VD	ANM (DRL)
11	Caverna do Marimbondo Caboclo/Água	CAG	GDS Rosado/RN	05° 29' 43,56"	37° 32' 43,46"	12		1 ( <i>P.por</i> )		D, MI	ANM (CL)
12	Caverna SN9	SN9	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,33"	37° 32' 41,71"				1 (UTO 6)	D, MI	ANM (CL)
13	Caverna Sombra de Ubaia	SUB	GDS Rosado/RN	05° 29' 41,64"	37° 32' 41,23"				1 (UTO 6)	D, MI	ANM (CL)
14	Caverna da Bota	BOT	Felipe Guerra/RN	05° 31' 30,85"	37° 37' 05,29"				7 (UTO 2)	D, MI, EP	ANM (RL)
15	Caverna do Arapuá	ARA	Felipe Guerra/RN	05° 31' 48,25"	37° 36' 58,48"				9 (UTO 2)	D, MI, EP	ANM (RL)
16	Caverna da Seta	SET	Felipe Guerra/RN	05° 32' 40,23"	37° 38' 03,10"				7 (UTO 2)	D, MI	ANM (CL)
17	Gruta da Rumana	RUM	Felipe Guerra/RN	05° 33' 54,12"	37° 39' 07,23"				10 (UTO 5)	D, A	-
18	Gruta do Buraco Redondo	BRD	Felipe Guerra/RN	05° 34' 42,98"	37° 39' 04,99"				9 (UTO 5)	D	ANM (DRL)
19	Gruta dos Troglóbios	TRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 24,27"	37° 39' 40,57"	11		5 ( <i>P.por</i> )	11 ( <i>K.tro</i> )	-	-
20	Caverna dos Crótes	CRO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 37,92"	37° 39' 30,89"		8 (UTO 2)	2 (UTO 2)	7 ( <i>K.tro</i> )	D, A	VD
21	Gruta da Descoberta	DBT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 47,50"	37° 39' 55,77"				9 ( <i>K.tro</i> )	D, A	-
22	Olho d'Água do Tetéu	ODT	Felipe Guerra/RN	05° 34' 02,63"	37° 40' 13,88"			4 ( <i>P.por</i> )		D, A	-
23	Caverna dos Dois	CDS	Felipe Guerra/RN	05° 34' 06,51"	37° 40' 50,42"				7 (UTO 4)	D	-
24	Caverna Duas Urtigas	URT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,48"	37° 41' 00,01"				2 (UTO 3)	D, MI	ANM (DRL)
25	Caverna da Raposa	RAP	Felipe Guerra/RN	05° 33' 36,15"	37° 41' 03,77"				2 (UTO 3)	D, MI	ANM (DRL)
26	Caverna Lapa I	LAI	Felipe Guerra/RN	05° 33' 35,50"	37° 41' 18,31"				8 (UTO 3)	D, MI	ANM (DRL)
27	Lapa I/Engano	LIE	Felipe Guerra/RN	05° 33' 41,89"	37° 41' 42,25"				6 (UTO 3)	D, MI	ANM (DRL)
28	Caverna do Mosteiro	MOS	Felipe Guerra/RN	05° 33' 45,61"	37° 41' 44,19"				6 (UTO 3)	D, MI	ANM (DRL)
29	Caverna Boa	CBO	Felipe Guerra/RN	05° 33' 59,50"	37° 41' 52,43"	9		3 ( <i>P.por</i> )	2 (UTO 3)	-	ANM (DRL)
30	Gruta dos Três Lagos	TLG	Felipe Guerra/RN	05° 35' 34,40"	37° 41' 12,70"	9	4 (UTO 3)	14 ( <i>P.por</i> )		VD, A, RF	ANM (DRL)

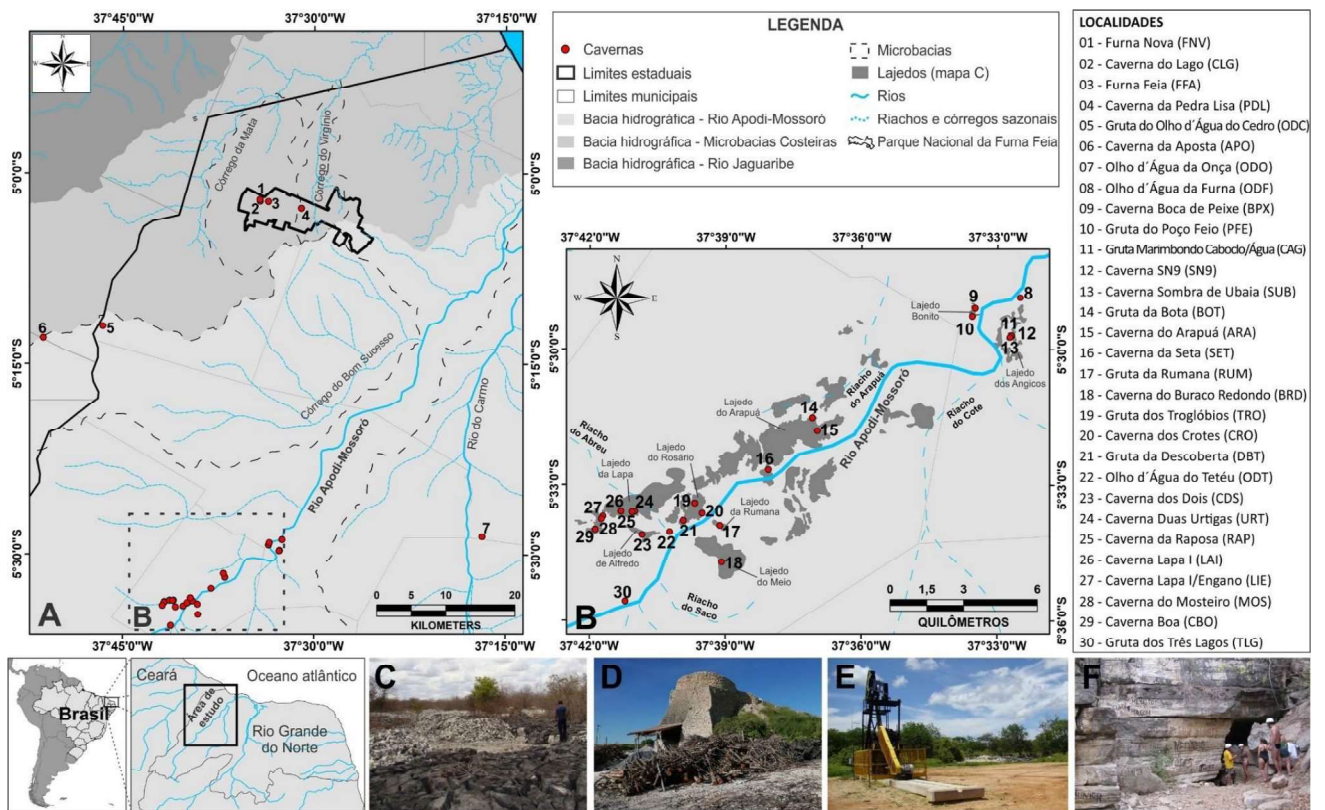


Figura 1. Localização das cavernas e nascentes cársticas que abrigam grupos-alvo deste estudo (A), ampliação da área com grande concentração de localidades nos municípios de Felipe Guerra/RN e Governador Dix-Sept Rosado/RN (B) e atividades antrópicas impactantes ao ambiente subterrâneo: mineração irregular no lajedo do Arapuá (C); forno de cal próximo ao Olho d'Água da Furna (localidade 08). É possível observar grande quantidade de lenha de vegetação nativa, resultado de desmatamento, utilizada como combustível na queima do calcário (D); exploração de petróleo próxima à caverna da Bota (14)(E); visitação desordenada no Poço Feio (10)(F).

## **Análises dos dados**

Para as análises genéticas, foi utilizado o mesmo conjunto de dados do Capítulo I, composto por sequências parciais do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade I (cox1), amplificadas por reação em cadeia de polimerase (PCR) com os primers LCO-1490 e HCO-2198 descritos por Folmer et al. (1994). Esse conjunto é composto por sequências parciais do cox1 de 593 pb de 67 indivíduos de Cirolanidae sp.1, com a identificação de 32 haplótipos em nove cavernas, e de 17 indivíduos de Cirolanidae sp.2 (nove haplótipos) de três cavernas. Para *Potiberaba* foram obtidas sequências parciais de 588 pb de 64 indivíduos e identificados 23 haplótipos em 11 localidades, além de sequências de 659 pb de 120 indivíduos de *Kinnapotiguara* (19 haplótipos) de 19 cavernas (Tabela 1).

A partir da análise de distribuição de haplótipos feita com o programa DNAsp v.5 (Librado e Rozas, 2009), foi construída uma rede de haplótipos usando TCS Network (Clement et al., 2002) no software PopArt (Leigh e Bryant, 2015), com o objetivo de visualizar os padrões de distribuição da diversidade genética.

Com o objetivo de avaliar padrões de particionamento genético e geográfico e determinar o número de populações nos táxons-alvo, foram utilizadas duas abordagens: a análise espacial de variância molecular (SAMOVA, Dupanloup et al., 2002); e a inferência bayesiana da estrutura genética de populações, implementada no BAPS 5.2 (Bayesian Analysis of Population Structure), por meio da opção Population mixture analysis – Clustering with linked loci (Corander e Tang, 2007; Corander et al., 2008) e 10 corridas independentes para cada cenário de  $K=2:n$  (onde  $n$  é o número de localidades). No caso do BAPS, a análise foi feita inicialmente para os táxons nominais e posteriormente para cada uma das UTO's com ocorrência em mais de uma localidade.

O software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) foi usado para calcular o índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ), como uma estimativa de fluxo gênico, entre todas as localidades de cada um dos táxons. Também com o uso do Arlequin 3.5 foram realizados testes de neutralidade, usando  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997), e calculados os índices de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $h$ ) para as diferentes populações (conforme resultados da SAMOVA) das UTOs identificadas em cada um dos táxons-alvo.

## **Identificação de ameaças**

Paralelamente à coleta de invertebrados, foram identificados empreendimentos e atividades antrópicas impactantes ao ambiente subterrâneo nas cavernas e entorno. Posteriormente, esse levantamento foi complementado com a observação de imagens de

satélites, por meio do software Google Earth Pro 7.3. A região de entorno foi delimitada pelas microbacias para os táxons aquáticos, e pelos lajedos para *Kinnapotiguara*, tendo em vista sua identificação no Capítulo I como determinantes para a distribuição das diferentes linhagens.

Além das observações em campo, foram levantadas outras possíveis ocorrências de atividades impactantes na literatura publicada (Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Fišer et al., 2013; Hoch e Ferreira, 2013; Souza et al., 2018a). Adicionalmente, foi realizado levantamento dos polígonos de direitos minerários na área de estudo por meio do Sistema de Informações Geográficas de Mineração (Sigmine) da Agência Nacional de Mineração (disponível em: <<http://sigmine.dnpm.gov.br/webmap/>>, acessado em 30 Nov. 2020). Foram considerados somente os polígonos em estágio avançado, ou seja, aqueles com relatório final de pesquisa mineral aprovado (Direito de Requerimento de Lavra, Requerimento de Lavra e Concessão de Lavra). Esses polígonos são importantes indicativos da instalação de empreendimentos de extração mineral nos próximos anos, e constituem ameaças potenciais aos ambientes subterrâneos.

### **Avaliação do risco de extinção**

A avaliação do risco de extinção foi realizada segundo o método de categorias e critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2019). Trata-se da abordagem mais abrangente, objetiva e cientificamente rigorosa para avaliar o risco de extinção, e é o modelo utilizado em todo o mundo e por governos de diversos países, incluindo o Brasil, para elaboração de listas nacionais de espécies ameaçadas (Souza et al., 2018).

Foram avaliados os estados de conservação dos complexos e também das linhagens crípticas (UTO's) identificadas no Capítulo I, com o objetivo de compará-los. Como o método da IUCN só considera táxons formalmente descritos, as linhagens ou espécies crípticas não são passíveis de avaliação. Isso pode levar a cenários não condizentes com o real risco de extinção.

Esse método utiliza categorias e critérios para definir o risco de extinção das espécies, por meio da análise e combinação de informações relacionadas ao tamanho populacional e informações sobre fragmentação, flutuações ou declínio passado e/ou projetado; extensão da distribuição geográfica, da área de ocupação e informações sobre fragmentação, declínio ou flutuações; ameaças que afetam a espécie; e medidas de conservação já existentes (Souza et al., 2018). Há cinco critérios utilizados para determinar o grau de ameaça de extinção e a categoria de risco, e uma espécie é considerada ameaçada se atender a pelo menos um deles: “A”, redução da população (passada, presente e/ou projetada); “B”, distribuição geográfica restrita e apresentando fragmentação, declínio ou flutuações; “C”, população pequena e com

fragmentação, declínio ou flutuações; “D”, População muito pequena ou distribuição muito restrita; e “E”, análise quantitativa de risco de extinção.

A maioria dos critérios inclui subcritérios que são utilizados para justificar mais especificamente a classificação de uma espécie em determinada categoria. Tendo em vista a ausência de informações populacionais com a precisão necessária para a aplicação dos critérios A, C e E, avaliamos o risco de extinção com base apenas nos critérios B e D (figura 2).

<b>B. Distribuição geográfica restrita e apresentando fragmentação, declínio ou flutuações</b>			
	<b>Criticamente Em Perigo</b>	<b>Em Perigo</b>	<b>Vulnerável</b>
<b>B1</b> Extensão de ocorrência	< 100 km <sup>2</sup>	< 5.000 km <sup>2</sup>	< 20.000 km <sup>2</sup>
<b>B2</b> Área de ocupação	< 10 km <sup>2</sup>	< 500 km <sup>2</sup>	< 2.000 km <sup>2</sup>
E pelo menos <b>2</b> dos seguintes itens:			
<b>(a)</b> População severamente fragmentada, OU número de localizações	= 1	≤ 5	≤ 10
<b>(b)</b> declínio continuado em um ou mais dos itens: (i) extensão de ocorrência; (ii) área de ocupação; (iii) área, extensão e/ou qualidade do habitat; (iv) número de localizações ou subpopulações; (v) número de indivíduos maduros.			
<b>(c)</b> flutuações extremas em qualquer um dos itens: (i) extensão de ocorrência; (ii) área de ocupação; (iii) número de localizações ou subpopulações; (iv) número de indivíduos maduros.			
<b>D. População muito pequena ou distribuição muito restrita</b>			
	<b>Criticamente Em Perigo</b>	<b>Em Perigo</b>	<b>Vulnerável</b>
<b>D</b> Número de indivíduos maduros	< 50	< 250	<b>D1.</b> < 1.000
<b>D2</b> Área de ocupação restrita ou número de localizações, sob uma ameaça futura plausível de levar o táxon à condição de CR ou EX em curto prazo.	-	-	<b>D2.</b> Tipicamente AOO < 20 km <sup>2</sup> ou Número de localizações ≤ 5

Figura 2. Resumo da aplicação dos critérios B e D do método IUCN, utilizados para categorizar o risco de extinção de uma espécie (modificado de Souza et al. 2018).

Para a aplicação desses critérios é necessário o cálculo da Extensão de Ocorrência (EOO) e/ou Área de Ocupação (AOO), além do número de localizações. A EOO é a área contida dentro do menor limite contínuo que possa ser traçado para englobar todos os pontos conhecidos, inferidos ou projetados da presença atual de um táxon; a AOO é a área ou a soma das áreas ocupadas por um táxon no interior da sua extensão de ocorrência (IUCN, 2019).

Para o cálculo da EOO foi medida a área do menor polígono convexo (MPC) no qual nenhum ângulo interno seja maior que 180° e que contenha todos os pontos de ocorrência (IUCN, 2019). Quando não foi possível o uso do MPC (menos de três ocorrências), a EOO foi calculada com base em uma linha com largura de 2 km ligando os dois pontos de ocorrência, ou considerada igual à AOO (uma ocorrência). Ainda segundo as regras da IUCN, caso o cálculo da EOO resulte em valor menor que a AOO, aquela deve ser igualada a esta (IUCN, 2019). A AOO foi calculada com base no método do esquadramento, no qual toda a área de extensão de ocorrência é sobreposta a grids de 2 km de lado (4 km<sup>2</sup>). A AOO então é calculada

somando a área de cada grid em que a espécie ocorre (IUCN, 2019). Os cálculos foram realizados no software GPS Trackmaker Pro 4.9 (<https://www.trackmaker.com/main/pt/>).

O número de localizações foi calculado com base na quantidade de áreas, geográfica ou ecologicamente distintas, nas quais um impacto teria que ocorrer para afetar toda a espécie (IUCN, 2019). O tamanho da localização depende da área abrangida pela ameaça e pode incluir parte de uma ou mais subpopulações, de forma que para esse cálculo foram levadas em consideração as populações de cada táxon ou UTO (definidas de acordo com as análises realizadas no SAMOVA e BAPS), e suas distribuições geográficas.

As UTOs que atendem aos requisitos para serem categorizadas como Criticamente em Perigo (Critically, CR), Em Perigo (Endangered, EN) ou Vulnerável (Vulnerable, VU) são aquelas efetivamente consideradas ameaçadas de extinção e, conseqüentemente, necessitam de ações prioritárias de conservação. As outras categorias possíveis são Quase Ameaçada (Near Threatened, NT) (quando não atende aos critérios para enquadrar-se em nenhuma das categorias de ameaça, mas fica próxima de atender, ou é provável que venha a se enquadrar em um futuro próximo), Menos Preocupante (Least Concern, LC) (quando não atende aos critérios) ou Dados Insuficientes (Data Deficient, DD) (quando não há informação adequada para uma correta aplicação dos critérios). Embora as espécies DD não entrem na lista de espécies ameaçadas, elas podem estar em risco de extinção, mas o conhecimento atual não permite tal afirmação, necessitando de maiores estudos para uma análise mais conclusiva (Souza et al., 2018).

### **Identificação de Áreas Prioritárias**

As áreas prioritárias para conservação foram identificadas com base na quantidade de linhagens, endemismos e respectivos graus de ameaça, presentes nas diferentes microbacias ou lajedos. Como o método de categorias e critérios da IUCN, de certa forma, já considera os endemismos (por meio do número de localizações), cada uma das áreas recebeu uma pontuação de acordo com o número de linhagens e suas respectivas categorias de ameaça: um ponto para cada linhagem não ameaçada, dois pontos para cada linhagem VU, três pontos para cada linhagem EN e quatro pontos para cada linhagem CR.

## **RESULTADOS**

### **Estrutura populacional**

Apenas *Cirolanidae* sp.1 apresentou um haplótipo compartilhado entre localidades distantes e inseridas em diferentes bacias: Hap\_6, presente em localidades na região das Microbacias Costeiras, na microbacia do Córrego da Mata (cavernas do Lago, CLG) e na

microbacia do Córrego do Virgínio (caverna da Pedra Lisa, PDL), e na bacia do rio Apodi-Mossoró (caverna da Água, CAG, localizada na microbacia do Riacho do Cote). Os demais haplótipos compartilhados ocorreram apenas em cavernas próximas, pertencentes a uma mesma microbacia (Hap\_17 e Hap\_19, presentes nas cavernas CLG e Furna Nova, FNV, ambas na microbacia do Córrego da Mata; Hap\_15, presente na caverna dos Três Lagos, TLG, e Caverna Boa, CBO, na microbacia do Riacho do Abreu) ou microbacias adjacentes (Hap\_14, compartilhado entre TLG e CBO, além da gruta dos Troglóbios, TRO, na microbacia do riacho do Arapuá) (Figura 3A, B).

*Cirolanidae* sp.2 apresentou haplótipos únicos de cada caverna, separados por vários passos mutacionais dos haplótipos pertencentes às outras UTO's com ocorrência em outras localidades (Figura 4A, B). Já *Potiberaba* e *Kinnapotiguara* apresentaram distribuição intermediária, com haplótipos compartilhados entre localidades próximas e pertencentes a uma mesma microbacia (Hap\_3 e Hap\_13), ou adjacentes (Hap\_1), no caso de *Potiberaba* (Figura 5A, B), ou a um mesmo lajedo (Hap\_1, entre cavernas no lajedo do Rosário; Hap\_10, Hap\_14 e Hap\_15, entre cavernas no lajedo da Lapa; Hap\_19, entre cavernas no lajedo dos Angicos), no caso de *Kinnapotiguara* (Figura 6A, B). Mas também há haplótipos únicos de cada localidade e separados por várias substituições para ambos os táxons, geralmente pertencentes às novas UTO's identificadas (Figuras 5 e 6).

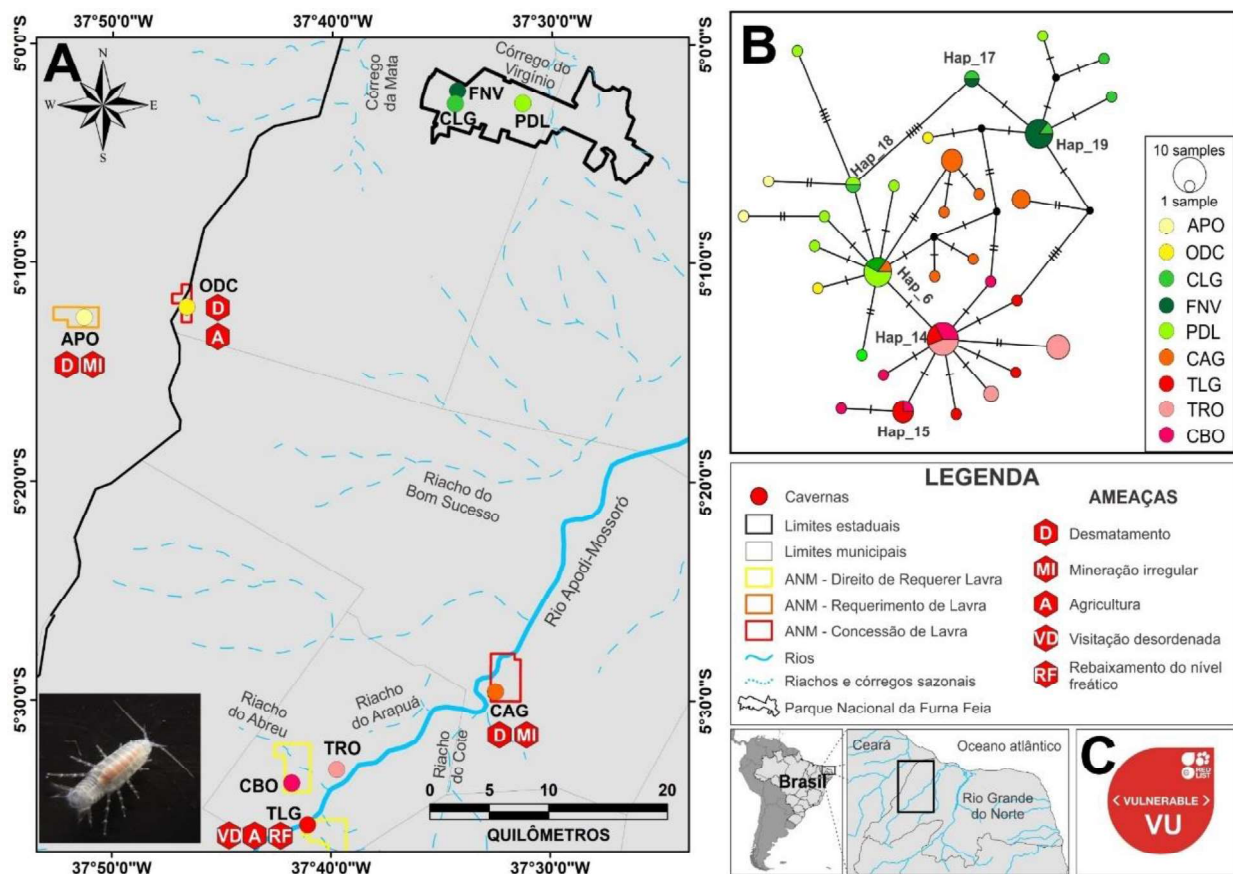


Figura 3. Distribuição das localidades com ocorrência de *Cirolanidae* sp.1, com indicação de ameaças antrópicas potenciais e incidentes (A), rede de haplótipos (B) e categorização do táxon conforme método de categorias e critérios da IUCN (C) (IUCN, 2019).

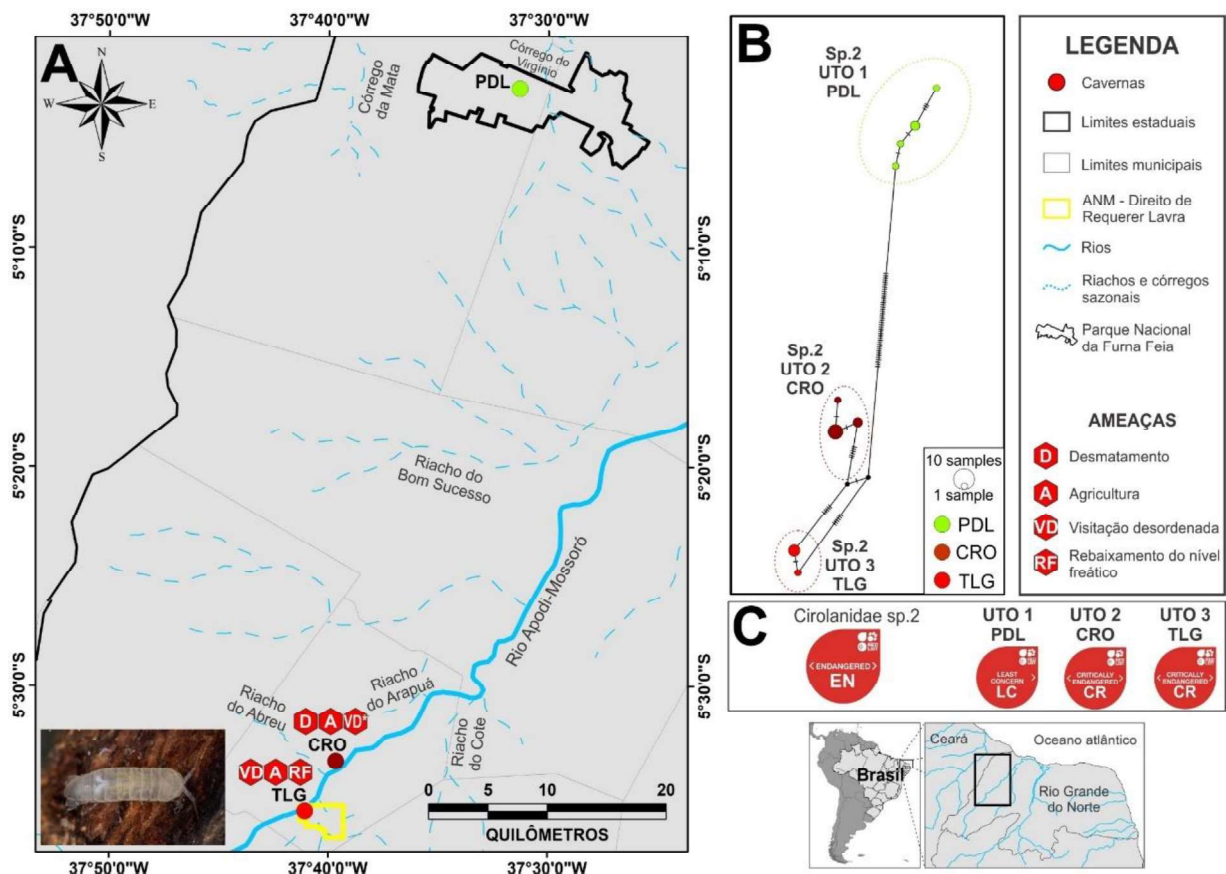


Figura 4. Distribuição das localidades com ocorrência de Cirolanidae sp.2, com indicação de ameaças antrópicas potenciais e incidentes (A), rede de haplótipos (B) e categorização do táxon e UTO's identificadas no Capítulo I, conforme método de categorias e critérios da IUCN (C) (IUCN, 2019).

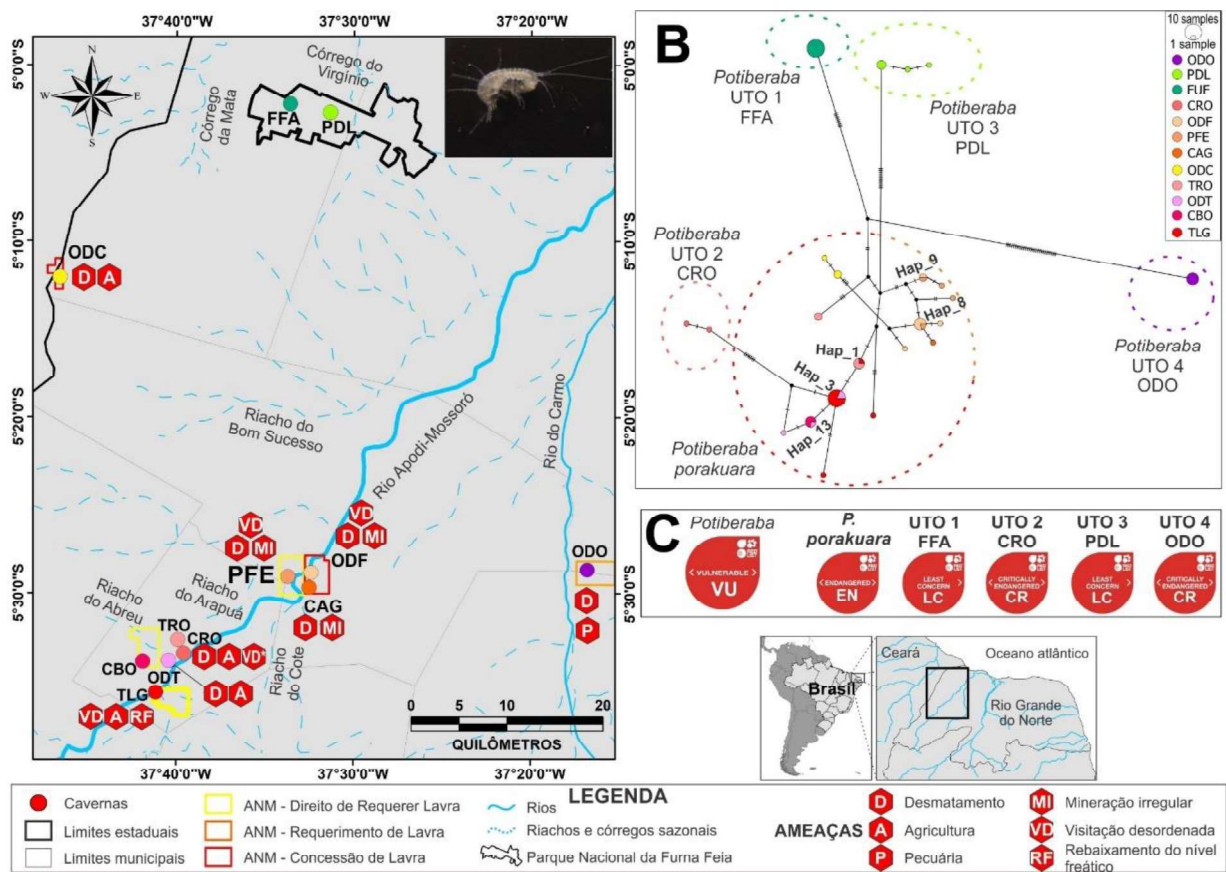


Figura 5. Distribuição das localidades com ocorrência de *Potiberaba*, com indicação de ameaças antrópicas potenciais e incidentes (A), rede de haplótipos (B) e categorização do táxon e UTO's identificadas no Capítulo I, conforme método de categorias e critérios da IUCN (C) (IUCN, 2019).

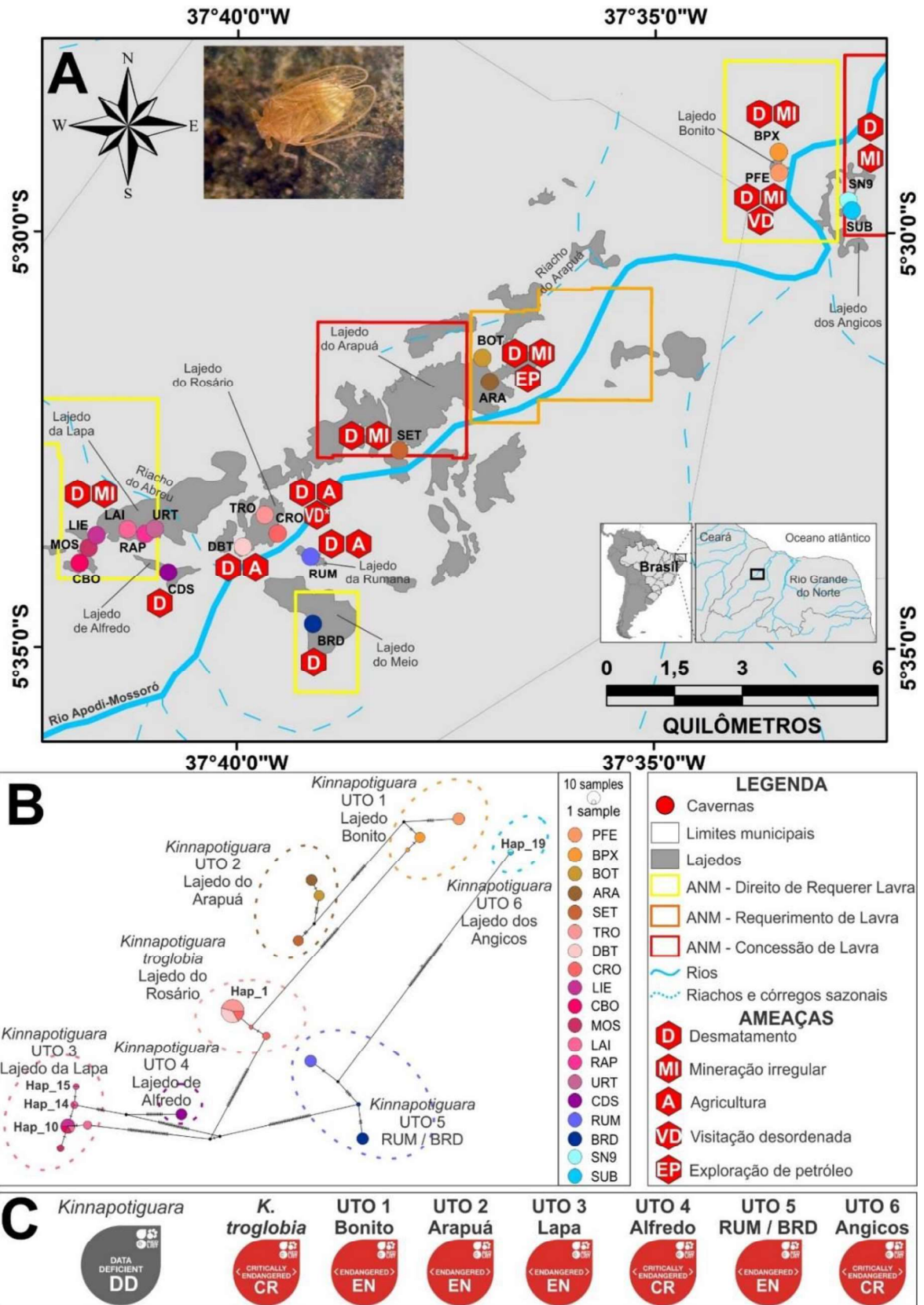


Figura 6. Distribuição das localidades com ocorrência de *K. troglobia*, com indicação de ameaças antrópicas potenciais e incidentes (A), rede de haplótipos (B) e categorização do táxon e UTO's identificadas no Capítulo I, conforme método de categorias e critérios da IUCN (IUCN, 2019).

As estimativas de fluxo gênico, com base nos valores de  $\Phi_{ST}$  entre diferentes localidades, mostram resultados compatíveis com as redes de haplótipos. Os valores de  $\Phi_{ST}$  para *Cirolanidae* sp.1 foram baixos em relação aos demais táxons, no entanto valores baixos e não significativos foram encontrados somente entre localidades próximas, como as cavernas Boa (CBO) e Três Lagos (TLG) ( $\Phi_{ST} = -0.03$ ) e entre a Furna Nova (FNV) e caverna do Lago (CLG) ( $\Phi_{ST} = 0.05$ ). Já para *Cirolanidae* sp.2, os valores foram elevados e significativos entre todas as localidades (variando de 0.95 a 0.98), indicando estruturação intensa e compatível com as diferentes UTO's identificadas no Capítulo I (Material suplementar 1).

Para *Potiberaba*, os valores de  $\Phi_{ST}$  foram significativos e elevados (1.00 ou valores muito próximos), no caso das novas UTO's identificadas no Capítulo I para as cavernas Furna Feia (FFA), Crotas (CRO), PDL e nascente cárstica do Olho d'Água da Onça (ODO). Valores baixos e não significativos foram encontrados entre localidades próximas, como TLG e ODT ( $\Phi_{ST} = 0.02$ ) e entre PFE e ODF ( $\Phi_{ST} = 0.16$ ) (Material suplementar 1).

Os indicativos mais robustos de estruturação populacional foram encontrados para *Kinnapotiguara*, com valores de  $\Phi_{ST}$  elevados e significativos entre praticamente todas as localidades, com exceção de cavernas no lajedo da Lapa (p. ex. 0.28 entre as cavernas Lapa I, LAI, e Lapa I/Engano, LIE) ou no lajedo do Rosário (variando de 0, entre TRO e DBT, a 0.35, entre CRO e TRO) (Material suplementar 1).

Esses resultados estão de acordo ainda com a SAMOVA e também com a inferência bayesiana da estrutura genética de populações (BAPS). A SAMOVA apontou os melhores cenários com sete populações para *Cirolanidae* sp.1 (que explicou 49.36% da variação genética observada), oito para *Potiberaba* (explicou 86.67%) e 12 para *Kinnapotiguara* (explicou 99.09%). Em todos esses casos, as subdivisões indicadas pelos melhores cenários estão de acordo ainda com as OTU's identificadas no Capítulo I. O único cenário possível para *Cirolanidae* sp.2 ( $k=2$ ) não retornou resultado significativo (Tabela 2).

A análise realizada no BAPS para os táxons nominais indicou três agrupamentos para *Cirolanidae* sp. 1 (com probabilidade de 0.9998,  $\log (ml) = -449.76$ ), três para *Cirolanidae* sp. 2 (probabilidade = 1,  $\log (ml) = -282.89$ ), seis para *Potiberaba* (probabilidade = 1,  $\log (ml) = -879.56$ ) e sete para *Kinnapotiguara* (probabilidade = 1,  $\log (ml) = -2340.47$ ) (Material suplementar 2), recuperando as UTO's identificadas no capítulo 1. Quando realizada também para as UTO's com ocorrência em mais de uma localidade, a análise foi geralmente coerente com os resultados da SAMOVA, exceto pela atribuição de indivíduos coletados em uma mesma localidade a diferentes populações (Tabela 2, Material suplementar 3).

Tabela 2. Inferência bayesiana da estrutura genética de populações (BAPS) e testes de análise espacial de variância molecular (SAMOVA) para subdivisões genéticas em diferentes números de populações para o Cox1 dos táxons-alvo deste estudo. Para a SAMOVA, apenas a melhor combinação (maior valor de  $\Phi_{CT}$  significativo) de cada táxon é apresentada. Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1. <sup>1</sup> Resultado combinado das análises realizadas para os táxons nominais e diferentes UTO's; <sup>2</sup> resultados da análise para os táxons nominais; <sup>3</sup> resultados da análise para a respectiva UTO; <sup>4</sup> tendo em vista a coleta de apenas um indivíduo em cada uma das duas localidades, e os mesmos compartilharem o mesmo haplótipo, não foi realizada a análise no BAPS para a UTO 6 de *Kinnapotiguara*; <sup>5</sup> tendo em vista o número de localidades (3), não foi possível realizar a SAMOVA com k=3 para *Cirolanidae* sp. 2.

Taxon	BAPS					SAMOVA							
	Nº de grupos (K) <sup>1</sup>	Composição dos grupos	UTO	Probabilidade	Log (ml)	Nº de grupos (K)	Composição dos grupos	UTO	Entre Grupos	Entre Populações, dentro dos grupos	Dentro das populações	$\Phi_{CT}$	P
<i>Cirolanidae</i> sp. 1	3	CBO + TLG + TRO ODC + CAG + CLG + FNV + PDL APO + ODC + CAG + CBO + CLG + PDL + TLG	sp. 1	0.9998 <sup>2</sup>	-449.76 <sup>2</sup>	7	CLG + FNV ODC PDL APO TRO CBO + TLG CAG	Sp.1	49.36	-2.32	52.96	0.494	0.003
<i>Cirolanidae</i> sp. 2	3	PDL CRO TLG	UTO 1 UTO 2 UTO 3	1 <sup>2</sup>	-282.89 <sup>2</sup>	2 <sup>5</sup>	PDL CRO + TLG	UTO 1 UTO 2 + UTO 3	75.77	22.15	2.08	0.758	0.327
<i>Potiberaba</i>	9	TRO + TLG + ODT + CBO TRO TLG PFE + ODF + CAG ODC FFA CRO PDL ODO	<i>P. porakuara</i>    UTO 1 UTO 2 UTO 3 UTO 4	1 <sup>3</sup>	-283.26 <sup>3</sup>	8	TLG + ODT + CBO TRO PFE + ODF + CAG ODC FFA CRO PDL ODO	<i>P. porakuara</i>    UTO 1 UTO 2 UTO 3 UTO 4	86.67	3.18	10.15	0.867	0
<i>Kinnapotiguara</i>	16	TRO + DBT + CRO CRO CRO PFE BPX BOT + ARA SET LIE + CBO + MOS + LAI LAI + RAP + URT LAI MOS RAP + URT CDS RUM BRD SN9 + SUB <sup>4</sup>	<i>K. troglobia</i>   UTO 1 UTO 2 UTO 3 UTO 4 UTO 5 UTO 6	1 <sup>3</sup> 0.99 <sup>3</sup> 0.71 <sup>3</sup> 0.93 <sup>3</sup> 1 <sup>3</sup>	-7.68 <sup>3</sup> -28.75 <sup>3</sup> -42.39 <sup>3</sup> -26.78 <sup>3</sup> -42.71 <sup>3</sup>	12	TRO + CRO + DBT PFE BPX BOT ARA SET LIE + CBO + MOS + LAI RAP + URT CDS RUM BRD SN9 + SUB	<i>K. troglobia</i>   UTO 1 UTO 2 UTO 3 UTO 4 UTO 5 UTO 6	99.09	0.46	0.46	0.991	0

## **Análises demográficas e de diversidade genética**

Os testes de neutralidade não apontam evidência de expansão ou retração populacional para as populações de *Cirolanidae* sp.2, *Potiberaba* e *Kinnapotiguara*. Em *Cirolanidae* sp.1, há indícios de expansão para as populações CBO + TLG ( $F_s = -6.282$ ,  $p = 0$ ;  $D = -1.610$ ,  $P = 0.04$ ), CLG + FNV ( $D = -1.686$ ,  $P = 0.04$ ) e PDL ( $F_s = -1.910$ ,  $p = 0.01$ ) (Tabela 3).

A diversidade haplotípica ( $h$ ) variou de 0.667 a 1 em *Cirolanidae* sp.1, enquanto a diversidade nucleotídica ( $\pi * 100$ ) foi geralmente baixa, variando de 0.24 (TRO) a 1.021 (ODC). Merece destaque a localidade CAG, com valores consideráveis de  $h$  (0.864) e  $\pi$  (0.754). Os elevados valores de  $h$  e  $\pi$  para as localidades APO e ODC podem estar relacionados ao baixo número de indivíduos sequenciados (2). Em *Cirolanidae* sp.2, os valores de  $h$  variaram de 0.5 a 0.9, e a diversidade nucleotídica foi baixa em todas as UTO's (variando de 0.084 a 0.372) (Tabela 3).

Em *Potiberaba*, as diversidades haplotípica e nucleotídica foram geralmente maiores nas populações de *P. porakuara* do que nas novas UTO's identificadas no Capítulo I. Em *Kinnapotiguara*, os valores de  $h$  e  $\pi$  foram geralmente baixos para todas as populações de todas as UTO's (Tabela 3).

## **Ameaças**

Identificamos sete ameaças antrópicas que impactam os ambientes subterrâneos nas áreas de ocorrência dos táxons-alvo (desmatamento, agricultura, mineração irregular, exploração de petróleo, pecuária, visitação desordenada e rebaixamento do nível freático), além de uma ameaça potencial (polígonos de direitos minerários).

Dessas, a ameaça mais abrangente é o desmatamento no entorno das localidades (afeta todos os quatro táxons e 10 das 16 UTO's). Todos os táxons e metade das UTO's ocorrem em áreas com polígonos de direitos minerários em estágio avançado na ANM, e podem ser impactados por futuros empreendimentos minerários. A agricultura afeta todos os táxons e seis linhagens, enquanto a mineração irregular de calcário afeta três táxons e cinco UTO's. A visitação desordenada ocorre atualmente somente nas localidades TLG e PFE, e é uma ameaça potencial às UTO's que ocorrem na caverna dos Crotos (que atualmente tem visitação esporádica e localizada, mas uma eventual intensificação pode atingir a região onde os táxons ocorrem), afetando assim todos os táxons e cinco UTO's.

As demais ameaças são localizadas: a exploração de petróleo ocorre apenas na região do lajedo do Arapúá (afetando as localidades BOT e ARA, com ocorrência da UTO 2 de *Kinnapotiguara*); o rebaixamento do nível freático foi reportado para TLG (afetando três táxons

e três UTO's); e a pecuária ameaça apenas a UTO 4 de *Potiberaba*, com ocorrência no Olho d'Água da Onça (ODO). Somente as localidades no interior do PNFF (que abrigam parte da distribuição de *Cironalidae* sp.1, a UTO 1 de *Cirolanidae* sp.2 e as UTO's 1 e 3 de *Potiberaba*) não estão expostas a ameaças antrópicas (Figuras 3 – 6, Tabelas 1 e 4).

Tabela 3. Índices de diversidade populacional e estatísticas de testes de neutralidades para o *cox1* dos táxons-alvo. Número de sequências (N), número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1; Populações de acordo com os resultados da SAMOVA apresentados na Tabela 2. \*  $P < 0.05$

<b>Cirolanidae sp.1</b>								
UTO	População	Índices de Diversidade Populacional					Testes de equilíbrio	
		N	H	S	h	$\pi * 100$	$F_s$ de Fu	D de Tajima
sp.1	APO	2	2	4	1	0.679	1.39	0
	ODC	2	2	6	1	1.021	1.79	0
	CAG	12	7	12	0.864	0.754	-0.333	0.476
	CBO + TLG	18	10	10	0.889	0.272	<b>-6.282*</b>	<b>-1.610*</b>
	CLG + FNV	12	5	9	0.667	0.296	-0.546	<b>-1.686*</b>
	PDL	10	7	15	0.867	0.537	<b>-1.910*</b>	-1.865
	TRO	11	3	3	0.691	0.240	1.322	1.316
<b>Cirolanidae sp.2</b>								
UTO	População	Índices de Diversidade Populacional					Testes de equilíbrio	
		N	H	S	h	$\pi * 100$	$F_s$ de Fu	D de Tajima
UTO 1	PDL	5	4	5	0.900	0.372	-0.848	-0.562
UTO 2	CRO	8	3	2	0.607	0.115	-0.478	-0.448
UTO 3	TLG	4	2	1	0.500	0.084	0.172	-0.612
<b>Potiberaba</b>								
UTO	População	Índices de Diversidade Populacional					Testes de equilíbrio	
		N	H	S	h	$\pi * 100$	$F_s$ de Fu	D de Tajima
<i>P. porakuara</i>	TRO	5	2	6	0.600	0.618	3.967	1.718
	TLG + ODT + CBO	21	7	13	0.705	0.442	-0.345	-1.033
	PFE + ODF + CAG	12	7	10	0.833	0.422	-1.916	-1.046
	ODC	3	2	1	0.667	0.114	0.201	0
UTO 1	FFA	11	1	0	0	0	-	0
UTO 2	CRO	2	2	1	1	0.170	0	0
UTO 3	PDL	5	3	2	0.700	0.170	-0.475	0.243
UTO 4	ODO	4	1	0	0	0	-	0
<b>Kinnapotiguara</b>								
UTO	População	Índices de Diversidade Populacional					Testes de equilíbrio	
		N	H	S	h	$\pi * 100$	$F_s$ de Fu	D de Tajima
<i>K. troglobia</i>	TRO + CRO + DBT	27	3	2	0.382	0.076	-0.0007	-0.071
UTO 1 - Bonito	PFE	8	1	0	0	0	-	0
	BPX	8	2	1	0.250	0.038	-0.182	-1.055
UTO 2 - Arapuá	BOT	7	1	0	0	0	-	0
	ARA	9	1	0	0	0	-	0
	SET	7	1	0	0	0	-	0
UTO 3 – Lapa	LIE + CBO + MOS + LAI	22	4	3	0.658	0.121	-0.431	-0.083
	RAP + URT	4	2	1	0.667	0.101	0.540	1.633
UTO 4 - Alfredo	CDS	7	1	0	0	0	-	0
UTO 5-RUM/BRD	RUM	10	1	0	0	0	-	0
	BRD	9	2	3	0.222	0.102	1.318	-1.513
UTO 6 - Angicos	SN9 + SUB	2	1	0	0	0	-	0

## Categorização IUCN

Calculamos a EOO para *Cirolanidae* sp.1 em 1395,2 km<sup>2</sup>, para *Cirolanidae* sp.2 em 62,11 km<sup>2</sup>, para *Potiberaba* em 2004,37 km<sup>2</sup> e para *Kinnapotiguara* em 50,06 km<sup>2</sup>. Com base no método do esquadramento, a AOO foi calculada em 32 km<sup>2</sup> para *Cirolanidae* sp. 1, 12 km<sup>2</sup> para *Cirolanidae* sp. 2, 36 km<sup>2</sup> para *Potiberaba* e 28 km<sup>2</sup> para *Kinnapotiguara*. O número de localizações, com base no número de populações definido pela SAMOVA (Tabela 2), foi de sete, três, oito e 12, respectivamente. A ocorrência de atividades antrópicas impactantes ao ambiente subterrâneo, em praticamente toda a distribuição dos táxons, permite afirmar que há declínio continuado da qualidade do habitat. Dessa forma, é possível categorizar *Cirolanidae* sp.1 e *Potiberaba* como VU e *Cirolanidae* sp.2 como EN, todos de acordo com o critério B1 e subcritérios ab(iii) (Figura 2, Tabela 4).

O número de localizações para *Kinnapotiguara* (12) excede por pouco o limite para categorização como VU (10), e pode ser categorizada como NT (Figura 2, Tabela 4). Apesar disso, a categorização como DD é preferível em função do desconhecimento, por exemplo, de como as ameaças atuais podem afetar diferentes populações em um mesmo lajedo (o que poderia reduzir o número de localizações).

É importante ressaltar que a aplicação do subcritério “a” para os critérios B1 e B2 pode levar em consideração, além do número de localizações, táxons com populações severamente fragmentadas (Figura 2), o que poderia, à primeira vista, ser aplicável para *Cirolanidae* sp.1, *Potiberaba* e *Kinnapotiguara*. No entanto, considera-se que uma espécie está severamente fragmentada se pelo menos 50% de sua AOO é formada por fragmentos menores do que o tamanho mínimo para suportar uma população viável (de acordo com os dados de ecologia) e, além disso, estes fragmentos devem estar separados de outros por grandes distâncias (de acordo com a capacidade de dispersão da espécie) (IUCN 2019). Assim, devido à ausência de dados ecológicos, não é possível afirmar que qualquer táxon deste estudo apresente populações severamente fragmentadas.

A categorização das diferentes UTO's resultou em cenários distintos, com mais unidades ameaçadas e maior risco de extinção, já que a maioria das linhagens crípticas está exposta a ameaças e apresenta EOO e/ou AOO e número de localizações muito menores (Tabela 4). Para *Cirolanidae* sp.2, há uma UTO categorizada como LC e duas como CR, segundo o critério B2 e subcritérios ab(iii) (Figura 4, Tabela 4). Para *Potiberaba*, há duas UTO's LC, uma EN, segundo o critério B1 e subcritérios ab(iii) (*P. porakuara*), e duas CR, segundo o critério B2 e subcritérios ab(iii) (Figura 5, Tabela 4). Para *Kinnapotiguara*, há quatro UTO's

categorizadas como EN, segundo os critérios B1 ou B2 e subcritérios ab(iii), e três CR (incluindo *K. troglobia*), segundo os mesmos critérios e subcritérios (Figura 6, Tabela 4). Somente as UTO's com ocorrência restrita ao PNFF não foram consideradas ameaçadas.

Tabela 4. Categorização dos táxons e diferentes UTO's alvos deste estudo, conforme método de Categorias e Critérios da IUCN (IUCN 2019). EOO – Extensão de Ocorrência; AOO – Área de Ocupação; L – número de localizações; Ameaças: PM – polígonos de direitos minerários, D – desmatamento, A - agricultura, MI - mineração irregular, EP – exploração de petróleo, P - Pecuária, VD - visitação desordenada, RF - rebaixamento do nível freático; \* - ameaça potencial.

Táxon	EOO (km <sup>2</sup> )	AOO (km <sup>2</sup> )	Ameaças	L	Categoria Critério	UTO	EOO (km <sup>2</sup> )	AOO (km <sup>2</sup> )	Ameaças	L	Categoria Critério
Cir sp1	1395,2	32	PM*, D, MI, A, P, VD, RF	7	VU B1ab(iii) +2ab(iii)	-	-	-	-	-	-
Cir sp2	62,11	12	PM*, VD, D, A, RF	3	EN B1ab(iii) +2ab(iii)	UTO 1 (PDL)	4	4	-	1	LC
						UTO 2 (CRO)	4	4	VD*, D, A	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 3 (TLG)	4	4	PM*, VD, A, RF	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
Potiberaba	2004,37	36	PM*, D, A, MI, VD, RF, P	8	VU B1ab(iii) +2ab(iii)	UTO 1 (FFA)	4	4	-	1	LC
						<i>P. porakuara</i>	433,24	24	PM*, D, A, MI, VD, RF	4	EN B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 2 (CRO)	4	4	VD*, D, A	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 3 (PDL)	4	4	-	1	LC
						UTO 4 (ODO)	4	4	PM*, D, P	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
Kinnapotiguara	50,06	28	PM*, D, A, MI, VD, EP	12	DD/NT	<i>K. troglobia</i>	4	4	D, A, VD*	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 1 Bonito	4	4	PM*, D, MI, VD	2	EN B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 2 Arapuá	8	8	PM*, MI, EP	3	EN B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 3 Lapa	4	4	PM*, D, MI	2	EN B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 4 Alfredo	4	4	D	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 5 RUM/BRD	4	4	PM*, D, A	2	EN B1ab(iii)+2ab(iii)
						UTO 6 Angicos	4	4	PM*, D, MI,	1	CR B1ab(iii)+2ab(iii)

## Áreas prioritárias para a conservação

Dentre as nove microbacias com ocorrência dos táxons troglóbios, a do riacho do Arapuá obteve a maior pontuação, 20 pontos. A maior parte dos pontos (17), no entanto, decorre das linhagens com ocorrência no lajedo do Rosário. Esse lajedo abriga parte considerável da variabilidade genética de todos os táxons-alvo deste estudo, com cinco UTO's, sendo três endêmicas do lajedo e criticamente ameaçadas de extinção (UTO 2 de *Cirolanidae* Sp.2, UTO 2 de *Potiberaba* e *K. troglobia*, incluindo a localidade-tipo – a gruta dos Troglóbios). Além dessas, ocorrem no lajedo uma população de *P. porakuara* (a população com a maior diversidade nucleotídica em *Potiberaba*,  $\pi * 100 = 0.618$ , ver Tabela 3), e uma de *Cirolanidae* sp.1 (ambas com ocorrência na gruta dos Troglóbios, TRO) (Tabela 5, Figura 7). Os outros três pontos decorrem da UTO 2 de *Kinnapotiguara*, com ocorrência nas cavernas do lajedo do Arapuá.

Em seguida vem a microbacia do riacho do Abreu, com 16 pontos. A gruta dos Três Lagos (TLG) faz jus aos nove pontos por abrigar três UTO's, sendo uma endêmica e CR (UTO 3 de *Cirolanidae* sp.1), a localidade-tipo de *P. porakuara* e parte da população de *Cirolanidae* sp.1 compartilhada com a caverna Boa (CBO) (a única população com valores negativos e significativos de *F<sub>s</sub>* e *D*, indicando expansão populacional, no lajedo da Lapa). O lajedo da Lapa, por sua vez, também abriga três UTO's, incluindo parte das populações de *Cirolanidae* sp.1 e *P. porakuara*, mencionadas anteriormente, e a UTO 3 de *Kinnapotiguara*, totalizando oito pontos. Também estão nesta microbacia o lajedo do Alfredo (UTO 4 de *Kinnapotiguara*, CR) e a localidade ODT (Tabela 5, Figura 7).

A microbacia do riacho do Cote recebeu 12 pontos. O lajedo dos Angicos abriga três UTO's, sendo uma endêmica e CR (UTO 6 de *Kinnapotiguara*), parte de uma população de *P. porakuara* e uma população de *Cirolanidae* sp.1 na Caverna da Água (CAG) (com elevadas diversidades haplotípica,  $h = 0.864$ , e nucleotídica,  $\pi * 100 = 0.754$ ). Próximo ao lajedo dos Angicos há o Olho d'Água da Furna (ODF), com ocorrência da mesma população de *P. porakuara* e, na outra margem do rio Apodi-Mossoró, o lajedo Bonito com as cavernas Boca de Peixe (BPX) e Poço Feio (PFE), que abriga a mesma população de *P. porakuara* e a UTO 1 de *Kinnapotiguara*. O conjunto de localidades na margem direita do rio Apodi-Mossoró recebe nove pontos, enquanto o da margem esquerda (lajedo Bonito), seis (Tabela 5, Figura 7).

A microbacia do riacho do Bom Sucesso recebeu cinco pontos em função da presença de populações de *Cirolanidae* sp.1 (VU) (cavernas APO e ODC) e de *P. porakuara* (EN)(ODC). Já a localidade ODO, na microbacia do rio do Carmo, abriga a UTO 4 de *Potiberaba*

(considerada CR) e recebe quatro pontos, enquanto a microbacia do riacho do Saco recebe três pontos em função da presença da UTO 5 de *Kinnapotiguara* (EM) nas cavernas RUM (lajedo da Rumana) e BRD (lajedo do Meio) (Tabela 5, Figura 7).

As localidades nas microbacias do córrego da Mata e córrego do Virgínio estão no interior do PNFF, que abriga parte da distribuição de *Cironalidae* sp.1 (VU), além da UTO 1 de *Cirolanidae* sp.2 e as UTO's 1 e 3 de *Potiberaba*, todas LC. Por já estarem em uma unidade de conservação de proteção integral, essas microbacias têm a menor prioridade de conservação.

Devido à proximidade do lajedo do Rosário com a microbacia do riacho do Abreu, é possível a sua união em uma área contínua que concentra as localidades com maior prioridade para conservação dos táxons-alvo (Área Prioritária 1; Tabela 5, Figura 7). A segunda área com maior prioridade é a que engloba o conjunto de localidades na microbacia do riacho do Cote (Área Prioritária 2; Tabela 5, Figura 7).

Tabela 5. Áreas prioritárias para ações de conservação das linhagens crípticas do oeste da formação Jandaíra. CAT – categoria de risco de extinção; Plin – pontuação da linhagem de acordo com a categoria de risco de extinção; PLaj/Loc – pontuação final do lajedo; PMic – pontuação final da microbacia; PFMic – Priorização final da Microbacia; AP – áreas prioritárias. Siglas das localidades de acordo com a Tabela 1. \* Localidades no Parque Nacional da Furna Feia.

Microbacia	Lajedo	Localidade	Linhagem	CAT	PLin	PLaj	PMic	PFMic	AP	
Riacho do Arapuá	Arapuá	BOT								
		ARA	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 2	EN	3	3				
	Rosário	SET								
		TRO	<i>Cirolanidae</i> sp.1	VU	2					
			<i>P. porakuara</i>	EN	3			20	1	
	Brejo	DBT	<i>K. troglobia</i>	CR	4		17			
		CRO	<i>Potiberaba</i> UTO 2	CR	4					
		<i>Cirolanidae</i> sp.2 UTO 2	CR	4						
		<i>Cirolanidae</i> sp.2 UTO 3	CR	4						
Riacho do Abreu	Brejo	TLG	<i>P. porakuara</i>	EN	3	9				
			<i>Cirolanidae</i> sp.1	VU	2					
	Lapa	CBO	<i>P. porakuara</i>	EN	3					
		MOS								
		LIE	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 3	EN	3		8			
		LAI								
		RAP								
URT										
Alfredo	CDS	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 4	CR	4	4		16	2		
Tetéu	ODT	<i>P. porakuara</i>	EN	3	3					
Riacho do Cote Margem direita	Angicos	SUB	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 6	CR	4					
		SN9	<i>Cirolanidae</i> sp.1	VU	2	9		9	3	
	CAG	<i>P. porakuara</i>	EN	3						
Gangorinha	ODF					3				
Riacho do Cote Margem esquerda	Bonito	PFE	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 1	EN	3	3				
		BPX	<i>P. porakuara</i>	EN	3	3		6	4	
Riacho do Bom Sucesso	Lajedo Grande	APO	<i>Cirolanidae</i> sp.1							
	Cedro	ODC	<i>Cirolanidae</i> sp.1	VU	2	5		5	5	
			<i>P. porakuara</i>	EN	3					
Rio do Carmo	Onça	ODO	<i>Potiberaba</i> UTO 4	CR	4	4		4	6	
Riacho do Saco	Rumana	RUM								
	Meio	BRD	<i>Kinnapotiguara</i> UTO 5	EN	3	3		3	7	
Córrego da Mata	Furna Feia	FUF*	<i>Potiberaba</i> UTO 1	LC	1					
	Furna Nova	FNV*				3				
	Furna Nova	CLG*	<i>Cirolanidae</i> sp.1	VU	2			5	8	
					2		(PNFF)			
Córrego do Virgínio	Pedra Lisa	PDL*	<i>Cirolanidae</i> sp.2 UTO 1	LC	1	4				
			<i>Potiberaba</i> UTO 3	LC	1					

ÁREA PRIORITÁRIA 1

ÁREA PRIORITÁRIA 2

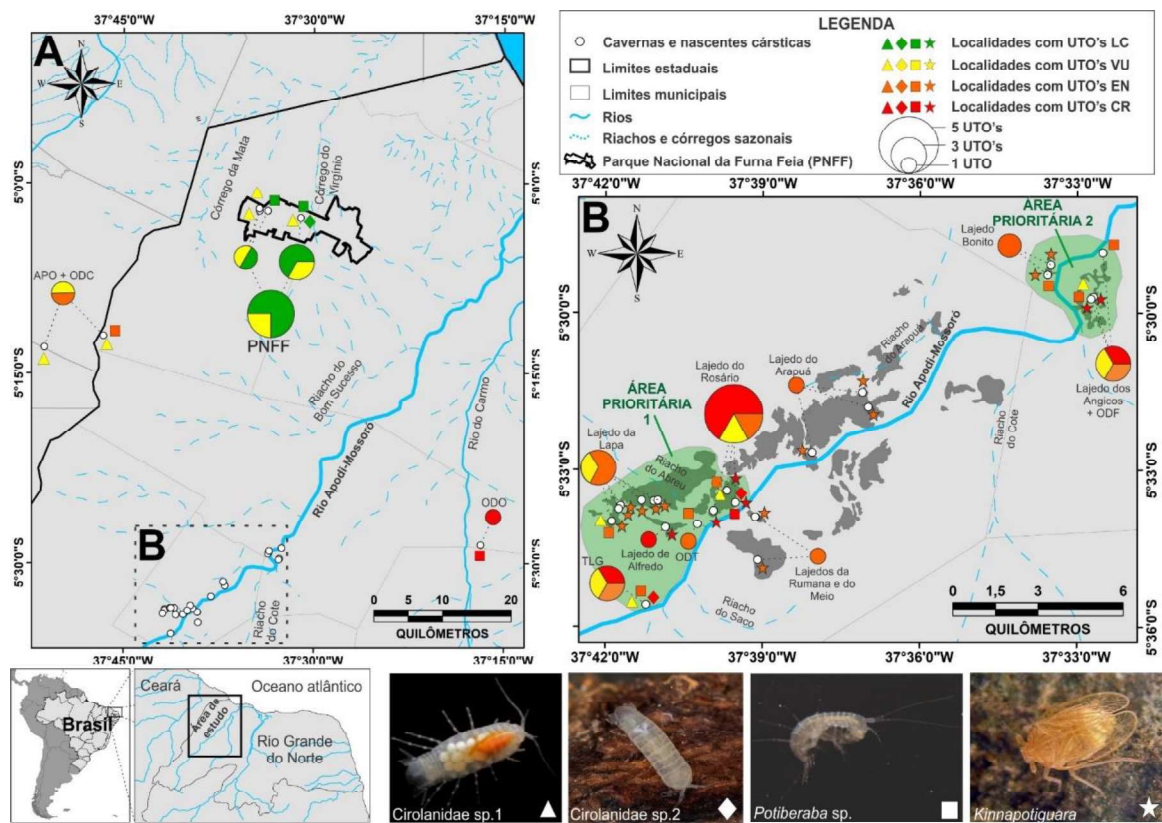


Figura 7. Distribuição e categorização do risco de extinção das diferentes UTO's dos artrópodes troglóbios do oeste da formação Jandaíra (A) e ampliação da área com grande concentração de localidades nos municípios de Felipe Guerra/RN e GDS Rosado/RN (B). Os gráficos de pizza têm diâmetro proporcional à quantidade de UTO's nas diferentes microbacias e/ou lajedos, indicando também a quantidade de linhagens em cada categoria de ameaça – Criticamente Ameaçada (CR, vermelho), Em Perigo (EN, laranja), Vulnerável (VU, amarelo) e Menos Preocupante (LC, verde).

## DISCUSSÃO

A análise de distribuição de haplótipos, estimativas de fluxo gênico e resultados da SAMOVA e BAPS são compatíveis com as UTO's identificadas no Capítulo I para todos os grupos. No entanto, há padrões populacionais distintos entre os diferentes táxons e também entre diferentes UTO's em um mesmo táxon. Em *Cirolanidae* sp.1, por exemplo, há um padrão de expansão na rede de haplótipos, com radiações de *singletons* raros e únicos a partir de haplótipos dominantes centrais. Esse padrão, embora menos claro, também pode ser observado em *P. porakuara* e na UTO 3 de *Kinnapotiguara*, com ocorrência no lajedo da Lapa.

Embora valores negativos e significativos para os testes de equilíbrio ( $F_s$  e/ou  $D$ ), indicativos de expansão populacional, só tenham sido encontrados para algumas populações em *Cirolanidae* sp.1, esse padrão na rede de haplótipos, e a associação de baixos valores de diversidade nucleotídica com alta diversidade haplotípica, pode ser resultante de gargalos populacionais seguidos de expansão (Avise, 1994), e também já foram identificados em besouros (Guzik et al., 2009) e anfípodas troglóbios na Austrália (Guzik et al., 2011; Bradford et al., 2013).

Somente uma população de *Cirolanidae* sp.1 (CAG) apresentou altas diversidades haplotípica e nucleotídica, embora alta diversidade haplotípica associada a moderada diversidade nucleotídica também possa ser observada para outra população de *Cirolanidae* sp.1 (PDL), bem como para algumas populações de *P. porakuara*. Isso é um indicativo de grandes populações estáveis, com longa história evolutiva e maior adaptabilidade a mudanças ambientais (Hewitt, 2004; Guzik et al., 2011).

O restante das populações, incluindo as novas UTO's identificadas em todos os táxons, apresentam baixa diversidade genética, o que pode indicar populações pequenas e geneticamente isoladas devido ao fluxo gênico altamente restrito ou inexistente, tendendo a ser altamente diferenciadas (Holsinger e Weir, 2009). A maioria das novas UTO's apresenta ainda baixas diversidade haplotípica e nucleotídica, chegando ao extremo de a maioria ou a totalidade de indivíduos em uma mesma população apresentarem um mesmo haplótipo, além da ausência de haplótipos compartilhados e indicativos de fluxo gênico altamente restrito ou ausente ( $\Phi_{ST}$  próximo ou igual a 1). Esse padrão parece ser frequente em organismos subterrâneos, e já foi identificado tanto para espécies terrestres (Mammola et al., 2015; Balogh et al., 2020) quanto aquáticas (Finston et al., 2007). Devido à perda de diversidade genética, principalmente por processos estocásticos, essas linhagens crípticas tendem a uma redução na adaptabilidade a

ambientes em mudança, levando ao comprometimento do crescimento populacional e elevado risco de extinção frente a impactos antrópicos (Carlson et al., 2014; Smith et al., 2014).

Com exceção das linhagens endêmicas de localidades no PNFF, as demais estão expostas a impactos antrópicos e podem ser consideradas ameaçadas de extinção. A mais abrangente das ameaças antrópicas incidentes sobre as linhagens subterrâneas foi o desmatamento. A perda de vegetação superficial pode resultar em alterações sobre regimes hidrológicos subterrâneos e entrada de nutrientes da superfície, podendo causar a redução de populações de espécies subterrâneas ou a extinção de populações/linhagens endêmicas (Mammola et al., 2019). É importante frisar que *Kinnapotiguara* é uma espécie fitófaga (Hoch e Ferreira, 2013), e que indivíduos de *Potiberaba* são encontrados sempre associados a raízes em algumas localidades (como ODF, PFE e ODT), indicando que podem ser dependentes de vegetação superficial.

Além do impacto inicial causado pelo desmatamento, a expansão e intensificação da agricultura aumentam a evapotranspiração (Destouni et al., 2013) e, assim, diminuem o escoamento de água e a recarga de aquíferos (Ceballos et al., 2015). Ademais, as águas subterrâneas e aquíferos cársticos são habitats frágeis e extremamente suscetíveis à contaminação por agrotóxicos e fertilizantes, pois geralmente têm baixo potencial de renovação e alta probabilidade de retenção de contaminantes (Ford e Williams, 2007). Também associada à agricultura, a superexploração das águas subterrâneas deve-se principalmente à irrigação agrícola (Siebert et al., 2010). Muito embora as águas subterrâneas sempre tenham sido utilizadas nas regiões áridas e semiáridas ao redor do mundo (Zektser e Everett, 2014), sua sobre-exploração pode levar à redução do nível freático, apontada como uma das principais ameaças aos ambientes subterrâneos (Mammola et al., 2019).

Outro impacto abrangente sobre as linhagens subterrâneas na área de estudo é a mineração irregular de calcário, frequentemente associada à indústria da cal. Além da utilização de lenha como combustível, com impactos à vegetação nativa que afetam indiretamente o ambiente subterrâneo, a extração de calcário pode levar desde a perturbações intensas no epicarste e fauna associada até a supressão de cavernas (Ferreira et al., 2010).

Embora ocorra em poucas cavernas, a visitação desordenada afeta diversas linhagens com impactos que vão desde o pisoteio e compactação do solo a alterações tróficas devido ao descarte de lixo (Ferreira et al., 2010). Além disso, a entrada de banhistas nos corpos d'água pode levar a um pisoteio de indivíduos e modificações das características da água, alterando a turbidez e destruindo micro habitats de uso da fauna aquática (Ferreira et al., 2010). Atualmente,

três cavernas no PNFF (incluindo a Furna Feia e Furna Nova) e outras três no lajedo do Rosário (incluindo a caverna dos Crotes) estão em fase de estudos para análise de viabilidade do uso turístico, de forma que os dados aqui levantados serão úteis para o manejo dessas cavernas.

Como esperado, as linhagens crípticas recém identificadas podem ser enquadradas em diferentes categorias de ameaça em relação aos complexos dos quais fazem parte – quase sempre em categorias que indicam um maior risco de extinção. As linhagens crípticas 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). Isso é particularmente preocupante no caso de linhagens crípticas que compõem espécie nominais que já se encontram ameaçadas (Bickford et al., 2007).

Assim, é necessária uma maior discussão a respeito das restrições para avaliação do risco de extinção, frequentemente focada somente em espécies formalmente descritas, quase sempre com base em um único conceito de espécie (IUCN, 2019; Stanton et al., 2019). Uma alternativa seria a possibilidade de avaliação do estado de conservação de UTO's delimitadas a partir de dados moleculares, o que possibilitaria a adoção de ações oficiais de conservação (tais como inclusão em listas oficiais e em Planos da Ação Nacionais) e minimizaria os impactos negativos do impedimento taxonômico na conservação destas linhagens.

Assim como a quase totalidade das UTO's aqui identificadas, a maioria das espécies subterrâneas é endêmica e com distribuição extremamente restrita (Gibert e Deharveng, 2002; Trontelj et al., 2009). Em função disso, mesmo ameaças localizadas têm maior probabilidade de causarem extinções e, desta forma, um efeito global sobre a biodiversidade (Mammola et al., 2019). Além disso, os troglóbios frequentemente apresentam alta longevidade e baixos metabolismo e fecundidade, resultando em crescimento populacional lento e instabilidade populacional devido a eventos catastróficos ou estocásticos (Mammola et al., 2019).

Soma-se a isso uma baixa tolerância a mudanças nas condições abióticas e a pouca redundância em comunidades subterrâneas (Gibert e Deharveng, 2002). Comunidades simples, com poucas espécies e muitas vezes sem redundância de papéis funcionais, exibem uma baixa resiliência ecológica e são mais vulneráveis a perturbações e distúrbios (Mammola et al., 2019). Assim, os táxons subterrâneos endêmicos são mais suscetíveis ao desequilíbrio ecológico e perda de habitat (Cardoso et al., 2010). Além de extremamente raras, tais espécies frequentemente constituem relictos, como ocorre com os táxons-alvo deste estudo, e isso

aumenta seu valor para ações de conservação (Nitzu et al., 2018). Apesar disso, ainda há escassez de planos de conservação adequados a invertebrados cavernícolas, frequentemente negligenciados em políticas de conservação da biodiversidade (Cardoso et al., 2011).

Mas se todas as linhagens fora do PNFF estão ameaçadas, quais devem ser priorizadas? Por um lado, a diversidade genética é importante para a conservação, pois altos níveis de diversidade nucleotídica e de haplótipos podem aumentar a aptidão individual e a resiliência, sendo a matéria-prima da seleção natural (Lande e Shannon, 1996). Assim, populações que não estão isoladas geneticamente são potencialmente mais resistentes e resilientes a mudanças. Por outro lado, uma baixa diversidade genética pode tornar linhagens mais suscetíveis à depressão por endogamia, e possivelmente à extinção. Tais linhagens têm importância para a conservação simplesmente porque são diferentes e raras (Nielsen et al., 2017).

Uma alternativa é a adoção de ações de conservação baseadas na manutenção da diversidade genética e relações evolutivas intra e interespecíficas, buscando preservar adequadamente os padrões evolutivos em nível de comunidade (Carvalho et al., 2017; Nielsen et al., 2017). Além disso, devem ser priorizadas áreas que concentrem não somente espécies raras e endêmicas, mas também aquelas que abrigam mais espécies ameaçadas e com maior risco de extinção (Possingham e Wilson, 2005; Fattorini, 2006; Fattorini et al., 2020).

A região de Felipe Guerra/RN, particularmente o lajedo do Rosário, abriga parte considerável da variabilidade genética de todos os táxons-alvo deste estudo, incluindo cinco UTO's - três endêmicas ao lajedo e criticamente ameaçadas de extinção, além de duas populações de outras linhagens menos ameaçadas. Áreas adjacentes ao lajedo do Rosário na microbacia do riacho do Abreu, incluindo o lajedo da Lapa, a gruta dos Três Lagos, o lajedo de Alfredo e o olho d'Água do Tetéu, também devem ser consideradas em possíveis estratégias de conservação. Essa região tem apenas cerca de 15 km<sup>2</sup> e abriga metade (oito, sendo seis endêmicas) das UTO's identificadas. Tal concentração está de acordo com estudos que apontam que áreas de maior diversidade genética são frequentemente coincidentes entre várias espécies (Hewitt, 1996), resultando em hotspots de diversidade genética ou concentrações de endemismo filogeográfico (Carnaval et al., 2014). Além dessa, a segunda área prioritária engloba as localidades na microbacia do riacho do Cote, em Governador Dix-Sept Rosado (lajedo dos Angicos, Olho d'Água da Furna e lajedo Bonito), talvez a região mais impactada da área de estudo (todas as localidades estão em áreas com mineração irregular e desmatamento relacionados à produção de cal, além de visitação desordenada).

É importante destacar que ambas as áreas identificadas como prioritárias coincidem com aquelas apontadas por duas iniciativas oficiais de priorização, visando à conservação da biodiversidade e do patrimônio espeleológico. A primeira é a atualização das Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização e Repartição de Benefícios da Biodiversidade da Caatinga, por meio da Portaria Nº 463/2018 do Ministério Meio Ambiente (MMA, 2018). As áreas identificadas como prioritárias neste estudo estão inseridas na área de código CA063 (Chapada do Apodi), considerada de importância biológica extremamente alta e com prioridade de ação muito alta para criação de unidade de conservação de Proteção Integral (MMA, 2018) (Figura 8).

A segunda é a publicação das Áreas prioritárias para conservação do patrimônio espeleológico Brasileiro (ICMBio/CECAV, 2018). As áreas identificadas como prioritárias neste estudo estão sobrepostas a três polígonos de categoria 1 de prioridade, cujas ações prioritárias são a criação ou ampliação de unidades de conservação; fiscalização e monitoramento; e educação ambiental e patrimonial (Figura 8).

Ações de conservação voltadas à proteção da biodiversidade subterrânea não trazem benefícios que envolvem somente a manutenção de linhagens extremamente endêmicas e relictas. As atividades antrópicas impactantes normalmente ocorrem de maneira desordenada na área de estudo, o que coloca em risco a sua própria sustentabilidade e, nesse contexto, ações de conservação e ordenamento podem trazer benefícios socioambientais. Quando conservamos espécies e habitats de água doce, recebemos múltiplos cobenefícios de biodiversidade. A fauna subterrânea aquática, por exemplo, fornece vários serviços ecossistêmicos na reciclagem de nutrientes e oxigenação de sedimentos (Griebler e Avramov, 2015; Hose e Stumpp, 2019; Abell e Harrison, 2020). Além disso, a conservação dos remanescentes florestais em áreas cársticas, essenciais para a manutenção do equilíbrio ecológico dos ambientes subterrâneos, contribui para a proteção das fontes de água superficiais e subterrâneas, melhorando a disponibilidade e a conservação dos recursos hídricos em áreas onde sua disponibilidade é limitada, especialmente em regiões semiáridas (Farrick e Branfireun, 2015).

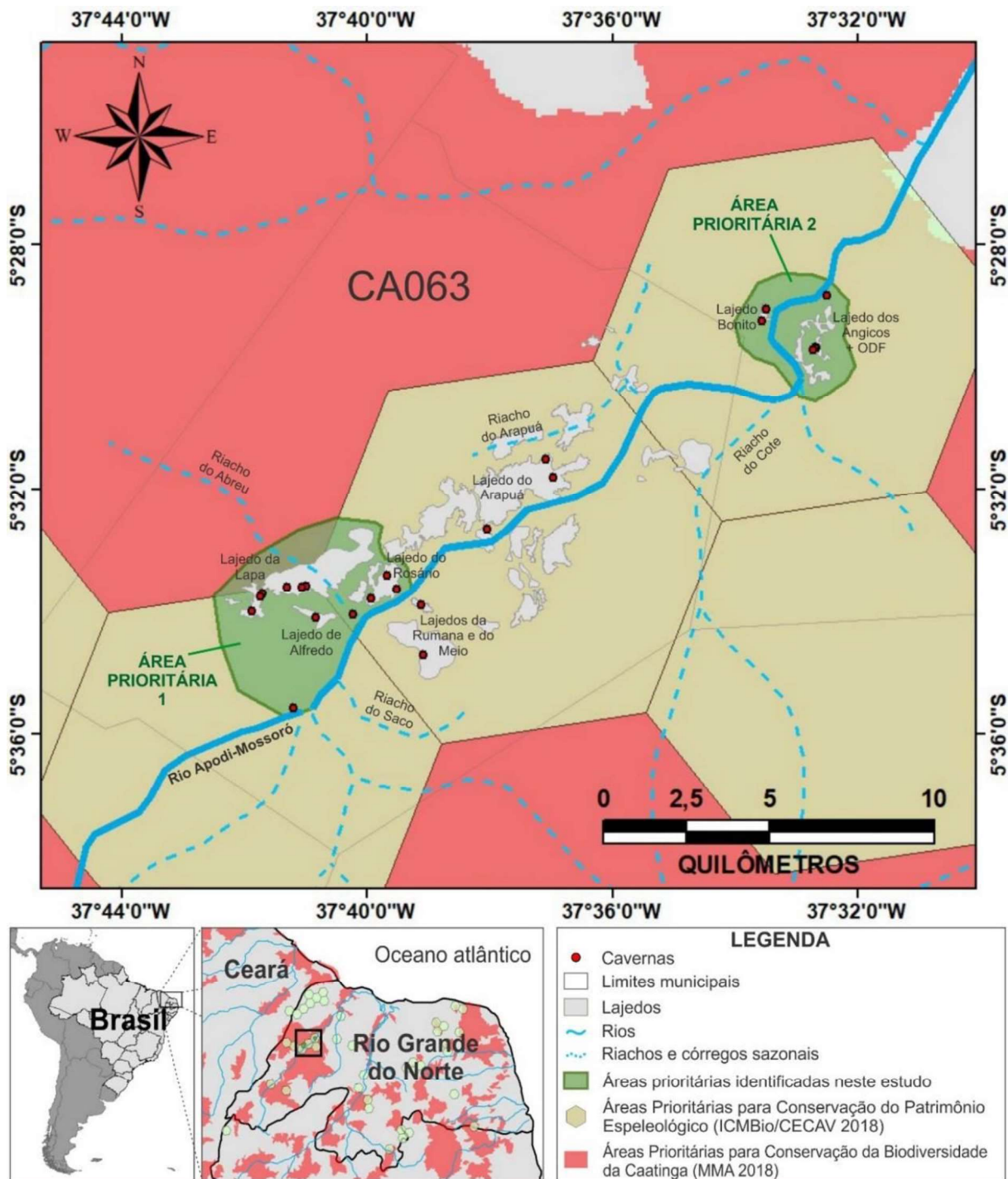


Figura 8. Sobreposição das áreas prioritárias identificadas neste estudo àquelas consideradas prioritárias para a conservação, utilização e repartição de benefícios da biodiversidade da Caatinga (MMA, 2018) e para a conservação do patrimônio espeleológico Brasileiro (ICMBio/CECAV, 2018).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ambientes subterrâneos, apesar de abrigarem formas de vida excepcionais e adaptações biológicas únicas, ainda são mal reconhecidos como prioridades de conservação. Além de fornecerem serviços ecossistêmicos vitais para a humanidade, representam ainda uma das últimas fronteiras de pesquisa (Mammola et al., 2019).

Mas, se mesmo os habitats subterrâneos acessíveis (cavernas) são muitas vezes desafiadores e exigem técnicas de exploração e equipamentos específicos (Zagmajster et al., 2010; Wynne et al., 2018), o que dizer da maioria dos espaços subterrâneos não acessíveis ou exploráveis, a menos que por meios indiretos (Culver e Pipan, 2014; Mammola, 2018; Ficetola et al., 2019)? A rede subterrânea de vazios e fissuras inacessíveis ao ser humano pode representar até mesmo o habitat principal para muitas espécies (Howarth, 1983). Diante disso, e se a extensão real do domínio subterrâneo é desconhecida (Ficetola et al., 2019), Mammola et al. (2019) questionaram o que pode ser feito na prática para proteger os ambientes subterrâneos.

O uso de abordagem filogeográfica comparada, considerando diferentes espécies subterrâneas com ampla distribuição, pode revelar padrões necessários à compreensão não só da distribuição de populações e linhagens como também dos fatores que a determinam. Além disso, estimativas de fluxo gênico entre diferentes cavernas podem indicar padrões de conectividade subterrânea e de disponibilidade de habitat, revelando áreas, além das cavernas, que também devem ser consideradas em estratégias de conservação.

Essas abordagens podem representar um primeiro passo no processo de garantir a proteção aos ambientes subterrâneos, indicando áreas e ações que devem ser priorizadas em um contexto de recursos cada vez mais escassos para a conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell R, Harrison IJ (2020) A boost for freshwater conservation. **Science** 370(6512): 38-39.
- Balogh A, Ngo L, Zigler KS, Dixon G (2020) Population genomics in two cave-obligate invertebrates confirms extremely limited dispersal between caves. **Scientific Reports** 10(1): 1-11.
- Beheregaray LB, Caccone A (2007) Cryptic biodiversity in a changing world. **J Biol** 6:1-5
- 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. **Biodiversity and Conservation**. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>.
- Bernardo J (2011) A critical appraisal of the meaning and diagnosability of cryptic evolutionary diversity, and its implications for conservation in the face of climate change. In: Hodkinson T, Jones M, Waldren S, Parnell J (eds) **Climate change, ecology and systematics**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 380–438 (Systematics Association Special Series).
- Bezerra FHR, Takeya MK, Sousa MOL, Nascimento AF (2007) Coseismic reactivation of the Samambaia fault, Brazil. **Tectonophysics** 430: 27–39.
- 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.
- Bradford TM, Adams M, Guzik MT, Humphreys WF, Austin AD, & Cooper SJ (2013) Patterns of population genetic variation in sympatric chiltoniid amphipods within a calcrete aquifer reveal a dynamic subterranean environment. **Heredity** 111(1): 77-85.
- Brasil. Decreto de 5 de junho de 2012. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional da Furna Feia, nos municípios de Baraúna e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jun. 2012.
- CANIE/CECAV (2020) **Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>. Acesso em 30 dez. 2021.
- Cardoso P, Borges PAV, Triantis KA, Ferrández MA, Martín HL (2010) Adapting the IUCN Red List criteria for invertebrates. **Biological Conservation** 144: 2432-2440. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.06.020>
- Cardoso P, Erwin TL, Borges PAV, New TR (2011) The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. **Biological Conservation**: 144: 2647-2655. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.07.024>.
- Carlson SM, Cunningham CJP, Westley PAH (2014) Evolutionary rescue in a changing world. **Trends Ecol. Evol.** 29: 521-530.
- Carnaval AC et al. (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 281, 20141461.
- Carroll SP, Jørgensen PS, Kinnison MT, et al. (2014) Applying evolutionary biology to address global challenges. **Science** 346: 313-324.

- Carvalho SB, Velo-Antón G, Tarroso P, Portela AP, Barata M, Carranza S, ... & Possingham HP (2017) Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the evolutionary continuum. **Nature Ecology & Evolution** 1(6): 1-8.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, & Palmer, TM (2015) Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Science Advances**, 1(5), e1400253.
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D, & Crandall K (2002) TCS: estimating gene genealogies. In Parallel and Distributed Processing Symposium, International (Vol. 2, pp. 0184-0184).
- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences** 205:19-31. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2006.09.015>.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics** 9:539. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-539>.
- 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.
- Culver DC, Pipan T (2014) **Shallow Subterranean Habitats: Ecology, Evolution, and Conservation**. Oxford University Press.
- Destouni G, Jaramillo F, Prieto C (2013) Hydroclimatic shifts driven by human water use for food and energy production. **Nature Climate Change** 3: 213.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology** 11(12): 2571-2581.
- Excoffier L, Lischer HL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10 (3): 564-567.
- Farrick KK, Branfireun BA (2015) Flowpaths, source water contributions and water residence times in a Mexican tropical dry forest catchment. **J Hydrol** 529:854–865. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.08.059>.
- Fattorini S (2006) A new method to identify importante conservation areas applied to the butterflies of the Aegean Islands (Greece). **Animal Conservation** 9: 75-83. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2005.00009.x>.
- Fattorini S (2010) Use of insect rarity for biotope prioritisation: the tenebrionid beetles of the Central Apennines (Italy). **Journal of Insect Conservation** 14: 367-378.
- Fattorini S, Fiasca B, Di Lorenzo T, Di Cicco M, & Galassi M (2020) A new protocol for assessing the conservation priority of groundwater-dependent ecosystems. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems** 30(8): 1483-1504.
- Ficetola GF, Canedoli C, Stoch F (2019) The Racovitza impediment and the hidden biodiversity of unexplored environments. **Conservation Biology** 33: 214–216.

- 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, 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): 294-9.
- Ford D, Williams P (2007) **Karst hydrogeology and geomorphology**. Wiley, New York.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147(2): 915-925.
- Funk WC, Caminer M, Ron SR (2012) High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. **Proc R Soc B** 279:1806–1814.
- Griebler C, Avramov M (2015) Groundwater ecosystem services: A review. **Freshwater Science** 34: 355–367.
- Gibert J, Deharveng L (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. **Bioscience** 52: 473–481.
- Guzik MT, Cooper SJB, Humphreys WF, Austin AD (2009) Fine-scale comparative phylogeography of a sympatric sister species triplet of subterranean diving beetles from a single calcareous aquifer in Western Australia. **Molecular Ecology** 18: 3683–3698.
- Guzik MT, Cooper SJB, Humphreys WF, Ong S, Kawakami T, & Austin AD (2011) Evidence for population fragmentation within a subterranean aquatic habitat in the Western Australian desert. **Heredity** 107(3): 215-230.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. **Biol. J. Linn. Soc.** 58: 247–276.
- Hewitt GM (2004) The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. **Frontiers in Zoology** 1(1): 4.
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . **Nature Reviews Genetics** 10(9): 639-650.
- Hose GC, Stumpp C (2019) Architects of the underworld: Bioturbation by groundwater invertebrates influences aquifer hydraulic properties. **Aquatic Sciences** 81, 20. <https://doi.org/10.1007/s00027-018-0613-0>.
- Howarth FG (1983) Ecology of cave arthropods. **Annual Review of Entomology** 28: 365–389.
- 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.
- IUCN Standards and Petitions Committee (2019) **Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria**. Version 14. Prepared by the Standards and Petitions Committee.

Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>>. Acesso em 30 Nov. 2020.

Lande R, Shannon S (1996) The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. **Evolution** 50:434–437.

Leigh JW, Bryant D (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** 6 (9): 1110-1116.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25(11): 1451-1452.

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 (2018) Finding answers in the dark: Caves as models in ecology fifty years after Poulson and White. **Ecography** 41: 1–21.

Mammola S, Cardoso P, Culver DC, Deharveng L, Ferreira RL, Fišer C, ... & Isaia M (2019) Scientists' warning on the conservation of subterranean ecosystems. **BioScience** 69(8): 641-650.

Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (Eds). **Species: the units of diversity**. Chapman and Hall, London, pp. 381-423.

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2018) Portaria Nº 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.

Myers N, Mittermeir RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853–858.

Nielsen ES, Beger M, Henriques R, Selkoe KA, & von der Heyden S (2017) Multispecies genetic objectives in spatial conservation planning. **Conservation Biology** 31(4): 872-882.

Niemiller ML, Near TJ, Fitzpatrick BM (2012) Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). **Evolution** 66:846–866.

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.

Nitzu E, Vlaicu M, Giurginca A, Meleg IN, Popa I, Nae A, & Baba Ş (2018) Assessing preservation priorities of caves and karst areas using the frequency of endemic cave-dwelling species. **International Journal of Speleology** 47(1).

Possingham HP, & Wilson KA (2005) Turning up the heat on hotspots. **Nature** 436: 919–920. <https://doi.org/10.1038/436919a>.

Rabelo JG, Maia RP, Bezerra FHR, Silva CCN (2020) Karstification and fluid flow in carbonate units controlled by propagation and linkage of mesoscale fractures, Jandaíra Formation, Brazil. **Geomorphology** 357, 107090. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2020.107090>.

- Ralls K, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MD, Fenster CB, Lacy R C, ... & Frankham R (2018) Call for a paradigm shift in the genetic management of fragmented populations. **Conservation Letters** 11(2), e12412.
- Silva JMC, Leal I, Tabarelli M (2017) **Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America**, first ed. Springer, New York.
- Smith TB, Kinnison MT, Strauss SY, Fuller TL & Carroll SP (2014) Prescriptive evolution to conserve and manage biodiversity. **Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, 1-22.
- Siebert S, Burke J, Faures JM, Frenken K, Döll P, Portman, FT (2010) Groundwater use for irrigation: A global inventory. **Hydrology and Earth System Sciences** 14: 1863–1880.
- Souza ECF, Brant A, Rangel CA, Barbosa LE, Carvalho CEG, Jorge RSP, Subirá RJ (2018) Avaliação do risco de Extinção da fauna brasileira: ponto de partida para a conservação da biodiversidade. **Diversidade e Gestão** 2(2): 62-75.
- 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.
- Stanton DW, Frandsen P, Waples RK, Heller R, Russo IRM, Orozco-terWengel PA, ... & Bruford, MW (2019) More grist for the mill? Species delimitation in the genomic era and its implications for conservation. **Conservation Genetics** 20(1): 101-113.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123 (3): 585-595.
- Trontelj P, Douady CJ, Fiser C, Gibert J, Goricki S, LeFebure T, Sket B, Zaksček V (2009) A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macrostygobionts? **Freshw Biol** 54:727–744.
- 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.
- White WB, Culver DC, Pipan, T (2019) **Encyclopedia of caves**, 3rd edn. Academic press.
- Wynne JJ, Bernard EC, Francis GH, Sommer S, Soto-Adames FN, Taiti S, Mockford EL, Horrocks M, Pakarti L & Pakarti-Hotus V (2014) Disturbance relicts in a rapidly changing world: the Rapa Nui (Easter Island) factor. **BioScience** 64 (8): 711-718. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu090>.
- Zagmajster M, Culver DC, Christman M, Sket B (2010) Evaluating the sampling bias in pattern of subterranean species richness: Combining approaches. **Biodiversity and Conservation** 19: 3035–3048.
- Zektser IS, Everett LG (2014) **Groundwater resources of the world and their use**. UNESCO, Paris

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar 1. Valores de  $\Phi_{ST}$  para as sequências *cox1* entre as diferentes localidades dos táxons troglóbios alvo. Siglas das localidades de acordo com a Tabela 1. \*  $p < 0.05$ .

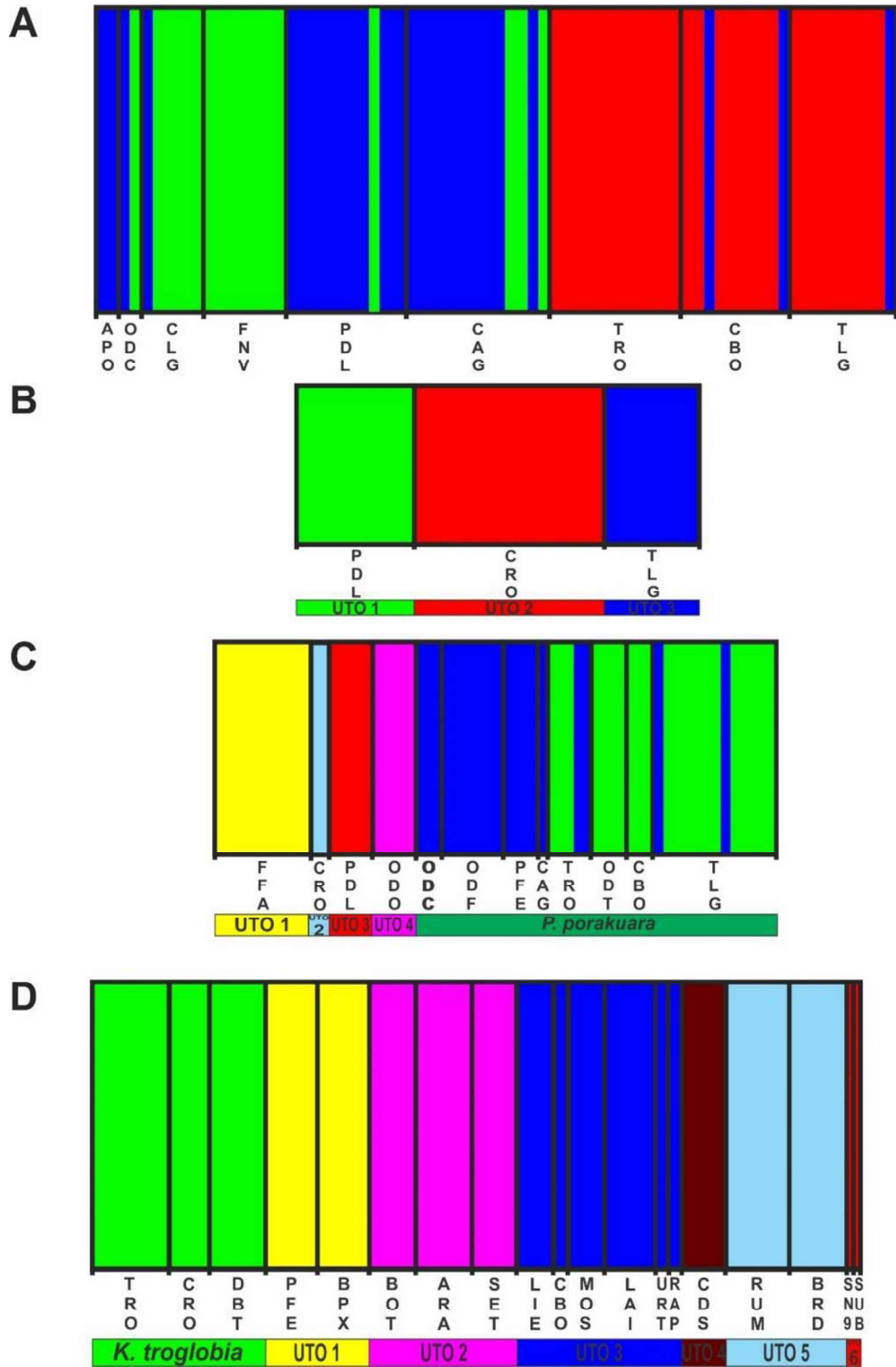
Cirolanidae sp.1									
	ODC	APO	CBO	TLG	CAG	TRO	FNV	CLG	PDL
ODC	-								
APO	0.17	-							
CBO	0.41*	0.56*	-						
TLG	0.41*	0.52*	-0.04	-					
CAG	0.06	0.25*	0.30*	0.31*	-				
TRO	0.57*	0.64*	0.23*	0.23*	0.42*	-			
FNV	0.66*	0.87*	0.85*	0.82*	0.54*	0.86*	-		
CLG	0.07	0.43	0.62*	0.59*	0.33*	0.69*	0.05	-	
PDL	0.08	0.20	0.20*	0.24*	0.12*	0.38*	0.66*	0.39*	-

Cirolanidae sp.2			
	PDL	CRO	TLG
PDL	-		
CRO	0.98*	-	
TLG	0.97*	0.95*	-

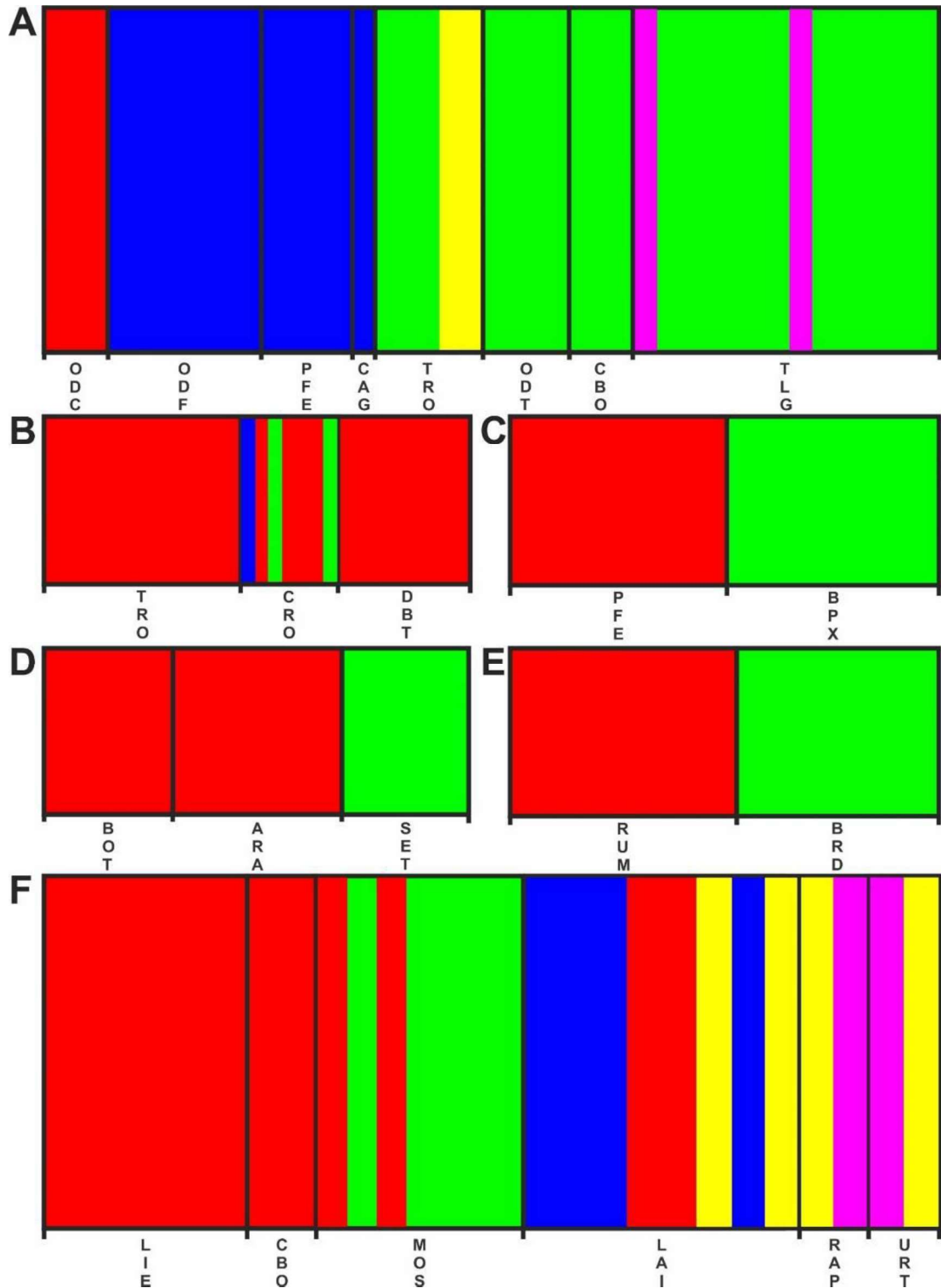
Potiberaba												
	TRO	CRO	FFA	ODO	TLG	ODT	CBO	CAG	PFE	ODF	ODC	PDL
TRO	-											
CRO	0.67	-										
FFA	0.93*	0.99*	-									
ODO	0.95*	0.99	1.00*	-								
TLG	0.24*	0.70*	0.88*	0.93*	-							
ODT	0.37*	0.87	0.98*	0.98*	0.02	-						
CBO	0.49	0.96	1.00*	1.00*	0.22*	0.13	-					
CAG	0.54	0.91	1.00	1.00	0.62	0.86	1.00	-				
PFE	0.48*	0.75	0.94	0.96*	0.58*	0.69*	0.76*	0.05	-			
ODF	0.64*	0.85*	0.95*	0.97*	0.67*	0.80*	0.85*	0.08	0.16	-		
ODC	0.65*	0.93	0.99*	0.99*	0.71*	0.89*	0.96	0.89	0.71*	0.76*	-	
PDL	0.85*	0.95	0.99*	0.99*	0.84*	0.93*	0.96*	0.94	0.88*	0.91*	0.95*	-

Kinnapotiguara																			
	TRO	CRO	DBT	BOT	ARA	SET	PFE	BPX	LIE	CBO	MOS	CDS	LAI	RAP	URT	RUM	BRD	SN9	SUB
TRO	-																		
CRO	0.35	-																	
DBT	0.00	0.31	-																
BOT	1.00*	0.98*	1.00*	-															
ARA	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	-														
SET	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	-													
PFE	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	-												
BPX	0.99*	0.97*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.98*	-											
LIE	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	-										
CBO	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.00	-									
MOS	0.99*	0.98*	0.99*	0.99*	1.00*	0.99*	1.00*	0.99*	0.60	0.40	-								
CDS	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	0.99*	-							
LAI	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.28	0.04	0.44*	0.97*	-						
RAP	0.99*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	0.88*	0.67	0.71*	0.99*	0.43	-					
URT	0.99*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	0.88*	0.67	0.71*	0.99*	0.43	-1.0	-				
RUM	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	-			
BRD	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	1.00*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.97*	-		
SN9	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.99	-	
SUB	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.99	0.00	-

Material Suplementar 2. Atribuição bayesiana para cada indivíduo inferida pelo programa BAPS para os táxons nominais alvo deste estudo (A – Cirolanidae sp. 1; B – Cirolanidae sp. 2; C – *Potiberada*; D – *Kinnapotiguara*). As linhas verticais indicam cada um dos indivíduos e as cores representam o coeficiente de associação de probabilidade daquele indivíduo para cada agrupamento genético. Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1.



Material Suplementar 3. Atribuição bayesiana para cada indivíduo inferida pelo programa BAPS para algumas UTO's alvo deste estudo (A – *P. porakuara*; B – *K. troglobia*; C – *Kinnapotiguara* UTO 1; D – *Kinnapotiguara* UTO 2; E – *Kinnapotiguara* UTO 5; F – *Kinnapotiguara* UTO 3). As linhas verticais indicam cada um dos indivíduos e as cores representam o coeficiente de associação de probabilidade daquele indivíduo para cada agrupamento genético. Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1.



# CAPÍTULO III

Um novo *hotspot* de biodiversidade subterrânea no Nordeste brasileiro

*A new hotspot of subterranean biodiversity in Northeastern Brazil*



## Um novo hotspot de biodiversidade subterrânea no Nordeste brasileiro

### 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 troglóbia 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 troglóbias que o sistema possui. Foram registradas 24 espécies troglóbias em nove cavernas no afloramento. Sequências parciais do gene mitocondrial *cox1* foram obtidas de 120 indivíduos de *Kinnapotiguara* 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 *Kinnapotiguara*, 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.

**Palavras Chave:** Caatinga, Cavernas, *Cox1*, Filogeografia, *Kinnapotiguara troglobia*, Troglóbios.

## A new hotspot of subterranean biodiversity in Northeastern Brazil

### ABSTRACT

Caves are generally characterized as extreme oligotrophic environments, being incapable of hosting a diverse fauna. However, it is now known that karst areas can exhibit considerable subterranean diversity. Currently, 38 hotspots of subterranean biodiversity hotspots are recognized, only two of which are in South America. The west of Rio Grande do Norte state stands out for its richness of troglobites, with great concentration in a single limestone outcrop, the Lajedo do Rosário, in the Felipe Guerra municipality. The distribution of some troglobites in different caves on the outcrop, particularly of the planthopper *Kinnapotiguara troglobia*, may indicate biological connectivity and continuity of the subterranean habitat. This study aims to present the diversity of the troglobitic fauna of Lajedo do Rosário and, based on the distribution of *K. troglobia* and using phylogeographic analysis, test the hypothesis that this outcrop is a continuous underground habitat formed by an interconnected system of caves and thus being, an hotspot of subterranean biodiversity in function of the number of troglobitic species that the system has. Twenty-three troglobitic species were recorded in nine caves on the outcrop. Partial sequences of the mitochondrial gene *cox1* were obtained from 120 individuals of *Kinnapotiguara* from 19 caves, being identified 19 divergent and generally unique haplotypes from each cave, with few exceptions that include a haplotype shared between three caves in Lajedo do Rosário. The  $\Phi_{ST}$  values indicate restricted or non-existent gene flow between populations from different caves, with few exceptions that include the Lajedo do Rosário. Molecular variance and population delimitation tests indicated that the genetic variation is explained by the distribution of caves in the outcrops, and the results indicate a gene flow of *K. troglobia* between caves in the Lajedo do Rosario, which demonstrates the existence of an interconnected system of caves in this formation. The subterranean biological connectivity between the caves that make up the Rosário system, evidenced by the contrasting phylogeographic pattern found between this outcrop and most of the other localities of *Kinnapotiguara*, proves that the Rosário slab can be considered a hotspot of subterranean biodiversity, since the troglobite species found there occur in an interconnected cave system. These results, together with the growing pressure due to anthropic activities, denote the urgent need to create a conservation unit in the area.

**Key Words:** Caatinga, Caves, *Cox1*, Phylogeography, *Kinnapotiguara troglobia*, Troglobites.

## INTRODUÇÃO

Os ambientes subterrâneos estão sujeitos a intercâmbios nas condições atmosféricas, recursos alimentares e fauna com os sistemas superficiais adjacentes (Culver, 1982). No entanto, diferem singularmente dos ambientes externos pela tendência a uma elevada estabilidade na temperatura e umidade e ausência permanente de luz nos locais mais profundos e distantes da superfície (Culver, 1982; Culver e Pipan, 2009). Os recursos tróficos disponíveis para a fauna subterrânea geralmente possuem origem secundária (importados da superfície por agentes físicos e biológicos) e, mais raramente, resultantes de quimiossíntese e crescimento de raízes que atingem os sistemas subterrâneos (Howarth, 1983; Ferreira et al., 2007; Souza-Silva et al., 2012). Assim, as cavernas são comumente ambientes oligotróficos, já que as vias de importação geralmente não são eficientes e tendem a não transportar grandes quantidades de recursos regularmente (Ferreira et al., 2007; Souza-Silva et al., 2012). Dessa forma, os organismos que vivem no meio hipógeo frequentemente apresentam especializações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, geralmente ligadas às limitações físicas e à disponibilidade de recursos alimentares (Culver, 1982; Holsinger e Culver, 1988; Culver e Pipan, 2009).

Em função dessas limitações, os ecossistemas subterrâneos por muito tempo foram considerados ambientes extremos e incapazes de abrigar uma fauna diversificada (Gilbert e Deharveng, 2002; Simon et al., 2007). Porém, sabe-se atualmente que sistemas cársticos podem abrigar uma ampla diversidade de habitats e uma rica fauna de vertebrados e invertebrados (Culver e Pipan, 2009).

Devido à sua singularidade biológica, endemismos e importância evolutiva, os ambientes subterrâneos têm constantemente atraído a atenção de cientistas (Culver e Pipan, 2009; Chertoprud et al., 2016; Glanville et al., 2016). Os organismos encontrados no meio subterrâneo podem ser considerados acidentais, usar as cavernas somente durante parte do seu ciclo de vida (trogloxenos) ou completá-lo dentro ou fora das cavernas (troglófilos). Entretanto, algumas espécies não ocorrem em habitats na superfície (epígeos), apresentando especializações para a vida exclusiva em ambientes subterrâneos - os troglóbios (Culver, 2001; Christiansen, 2005; Culver e Pipan, 2009).

No intuito de indicar áreas de grande relevância bioespeleológica, Culver e 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 e Pipan (2009) identificaram outros 16 *hotspots*, no entanto

nenhum havia sido identificado na região Neotropical até Souza-Silva e Ferreira (2016) inserirem dois *hotspots* brasileiros, a Toca do Gonçalo (Bahia) e o Sistema Areias (São Paulo), na seleta lista. Dos 38 *hotspots* atualmente identificados, apenas cinco estão na região tropical (Pipan et al., 2020). 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 e Bichuette, 2010; Souza-Silva et al., 2015; Souza-Silva e Ferreira, 2016; Souza et al., 2017).

A grande heterogeneidade ambiental do bioma Caatinga e a singularidade de alguns de seus ambientes permitem prever que esse bioma abrigue uma rica fauna de invertebrados, com muitas espécies endêmicas (Silva et al., 2004; Ferreira et al., 2010). Entretanto, a escassez de estudos tem mantido a incerteza da real diversidade do bioma e, apesar de alguns trabalhos com foco em invertebrados terem sido conduzidos em ecossistemas de superfície (Araújo et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Ernesto et al., 2018), a fauna subterrânea e as condições e recursos que determinam essa biodiversidade ainda permanecem majoritariamente negligenciados (Ferreira et al., 2010). Trata-se, portanto, de uma importante lacuna de conhecimento, tendo em vista que a Caatinga representa uma das maiores savanas do mundo, abrangendo cerca de 735.000 km<sup>2</sup> da região Nordeste do Brasil (Prado, 2003). É ainda o único bioma exclusivamente brasileiro, o que significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo, exceto no nordeste do Brasil (Silva et al., 2004).

Estudos recentes, no entanto, têm apontado grande relevância bioespeleológica de algumas áreas cársticas na Caatinga, como as regiões de Campo Formoso (Souza-Silva e Ferreira, 2016), Chapada Diamantina (Gallão e Bichuette, 2015), Serra do Ramalho (Trajano et al., 2016) e Serra do Iuiú (Cardoso et al., 2021) na Bahia, além do oeste do Rio Grande do Norte (Ferreira et al., 2010; Hoch e Ferreira, 2013; Fisër et al., 2013; Leal-Zanchet et al., 2014; Bento et al., 2016; Souza et al., 2018).

O oeste Potiguar se destaca pela riqueza de espécies troglóbias e estigóbias (troglóbios aquáticos), incluindo as únicas espécies consideradas 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).

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 e 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 e Ferreira, 2013).

Diante do exposto, 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. Assim, o presente trabalho tem por objetivo apresentar a diversidade da fauna troglóbia do lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN. Objetiva ainda 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.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de Estudo**

O lajedo do Rosário está localizado na margem esquerda do rio Apodi-Mossoró, nas proximidades do distrito de Passagem Funda e a nove quilômetros a nordeste da sede do município de Felipe Guerra, no oeste do Rio Grande do Norte (RN). O afloramento tem em torno de 1,5 km de extensão (no sentido NE-SW) e 500 m de largura (no sentido N-S), ocupando

uma área de apenas 0,7 km<sup>2</sup> (Carneiro et al., 2015) (Figura 1). Esse afloramento calcário, além dos demais onde estão inseridas as outras cavernas com ocorrência de *K. troglobia*, fazem parte do grupo Apodi/formação Jandaíra, que é a mais extensa área de afloramento de carbonatos fanerozóicos do Brasil (Bezerra et al., 2007). Tais rochas constituem uma rampa carbonática que aflora em praticamente toda a porção emersa da Bacia Potiguar, incluindo a porção norte do Rio Grande do Norte e Nordeste do Ceará (Bertani et al., 1990; Bezerra et al., 2007). Essa rampa foi submetida, durante e após sua deposição, a diversos episódios de soerguimento provocando exposição subaérea e erosão que resultaram em intensa carstificação e dissolução (Bertani et al., 1990; Bezerra et al., 2007).

A região insere-se no domínio da Caatinga e apresenta clima quente e semiárido, predominantemente do tipo BSh segundo a classificação climática de Köppen (Alvares et al., 2013). A temperatura média é constante durante o ano, variando de 25 a 30°C, enquanto a precipitação média anual situa-se em torno de 800mm (Silva et al., 2017).

#### **Coleta de espécimes de *Kinnapotiguara***

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. Todos os habitats potenciais (principalmente áreas úmidas e com raízes) foram inspecionados visualmente. Indivíduos de *Kinnapotiguara* foram coletados manualmente com o uso de pinças e pincéis, conservados em etanol absoluto (99,5% P.A) e armazenados sob refrigeração (-20° C).

#### **Levantamento da fauna troglóbia**

O levantamento de dados referentes à fauna troglóbia do lajedo do Rosário foi realizado a partir da literatura publicada (Ferreira et al., 2010; Hoch e Ferreira, 2013; Ázara e Ferreira, 2014; Leal-Zanchet et al., 2014; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021).

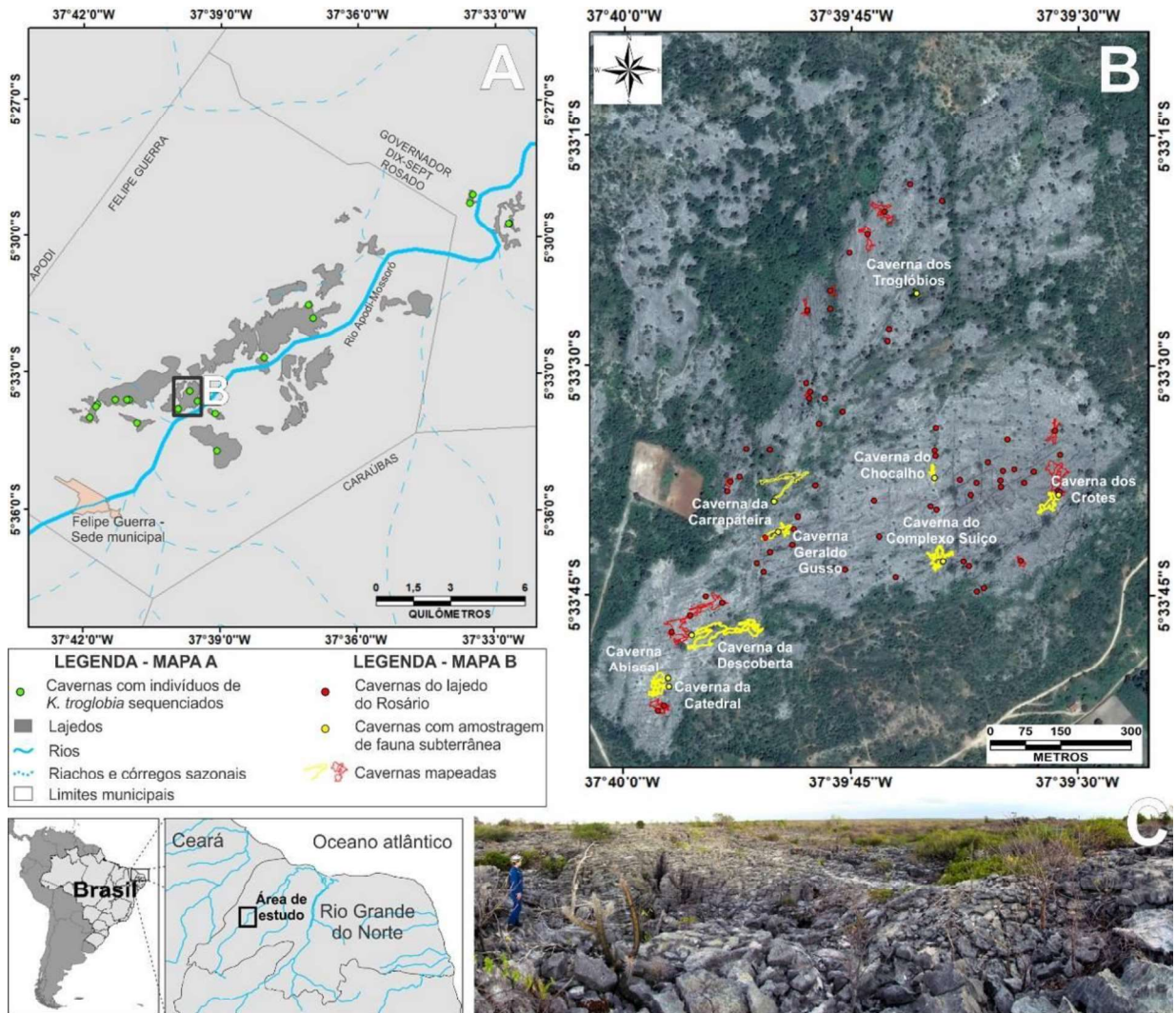


Figura 1. Localização das cavernas com ocorrência de *Kinnapotiguara* e coleta de indivíduos para sequenciamento (A), além da distribuição das cavernas conhecidas, atualmente mapeadas e com inventários bioespeleológicos na área do lajedo do Rosário (B). Imagem panorâmica do lajedo do Rosário (C).

### Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi extraído dos indivíduos de *Kinnapotiguara* preservados em etanol utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Foram 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).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25µl contendo 5 µl de tampão 5x GoTaq Reaction (Promega), 2,4 µl de MgCl<sup>2</sup> (25mM), 2 µl de dNTP (2mM), 2 µl de DMSO, 0,5 µl de cada primer (10mM), 0,2 µl da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 4 µl

de DNA genômico total. O perfil de termociclagem incluiu 1 ciclo de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 48°C, 1 minuto a 72°C; e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

Todos os produtos de PCR foram 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). As reações de sequenciamento, em ambos os sentidos, foram realizadas em volumes de reação de 10 µl contendo 0,5 µl de BigDye 2,5, 2 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems), 2 µl dos produtos de PCR e 0,5 µl de primer. O perfil de termociclagem foi: um ciclo de 1 minuto a 96°C, 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3730-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **Análises dos dados**

As sequências consenso foram montadas com uso do software Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime/>) e alinhadas usando ClustalW (Thompson et al., 1994), implementado no programa Mega X (Kumar et al., 2018), seguidas por inspeção visual para ajustes finais. Adicionalmente, as sequências de DNA foram traduzidas em aminoácidos para verificar stop códons prematuros ou indels. Testes de saturação foram realizados no programa DAMBE7 (Xia, 2018).

A partir da análise de distribuição de haplótipos realizada com o programa DNAsp v.5 (Librado e Rozas, 2009), foi construída uma rede de haplótipos usando TCS Network (Clement et al., 2002) no software PopArt (Leigh e Bryant, 2015), com o objetivo de visualizar diferenças em sua distribuição e passos mutacionais.

O software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) foi usado para calcular o índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ), como uma estimativa de fluxo gênico entre as localidades. Também com uso do Arlequin 3.5, a análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para avaliar quanto da variação genética em *Kinnapotiguara* pode ser explicada pela distribuição das cavernas nos afloramentos calcários.

Com o objetivo de avaliar padrões de particionamento genético e geográfico e determinar o número de populações em *Kinnapotiguara*, foram utilizadas duas abordagens: a análise espacial de variância molecular, SAMOVA (Dupanloup et al., 2002); e, de forma complementar, a inferência bayesiana da estrutura genética de populações, implementada no BAPS 5.2 (Bayesian Analysis of Population Structure) por meio da opção Population mixture analysis – Clustering with linked loci (Corander e Tang, 2007; Corander et al., 2008). A análise

no BAPS foi realizada com o objetivo de identificar os agrupamentos existentes em um mesmo afloramento calcário, desde que possuíssem mais de uma caverna com ocorrência de *Kinnapotiguara*.

## RESULTADOS

### Fauna troglóbia do lajedo do Rosário

Um total de 24 espécies troglóbias encontra-se registrado na literatura para nove cavernas amostradas no Lajedo do Rosário (Tabela 1), 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).

Os troglóbios terrestres são maioria, com 15 espécies, e há nove espécies estigóbias (incluindo quatro que são consideradas relictos oceânicos) (Tabela 2; Figura 2). Apenas quatro espécies estão formalmente descritas: *K. troglobia* (Hemiptera: Fulgoromorpha), novo gênero e o segundo registro de um Kinnaridae troglóbio no Brasil (Hoch e Ferreira, 2013); *Potiberaba porakuara* Fisër, Zgamažster & Ferreira, 2013 (Amphipoda: Mesogammaridae), novo gênero e primeiro registro da família na América do Sul (Fisër et al., 2013); *Hausera hauseri* Leal-Zanchet & Souza, 2014 (Platyhelminthes: Tricladida), novo gênero e primeiro registro da subordem Cavernicola na América do Sul (Leal-Zanchet et al., 2014); e *Newportia potiguar* Ázara & Ferreira, 2014 (Scolopendromorpha: Scolopocryptopidae) (Ázara e Ferreira, 2014).

Tabela 1. Relação das cavernas no lajedo do Rosário com inventários bioespeleológicos.

Nome da caverna	Sigla	Coordenadas	
		Latitude (S)	Longitude (W)
Caverna dos Troglóbios	TRO	05° 33' 24.27"	37° 39' 40.57"
Caverna dos Crotas	CRO	05° 33' 38.77"	37° 39' 31.54"
Caverna Abissal	ABI	05° 33' 51.06"	37° 39' 57.29"
Caverna da Carrapateira	CAR	05° 33' 38.22"	37° 39' 50.32"
Caverna da Catedral	CAT	05° 33' 50.49"	37° 39' 57.37"
Caverna Complexo Suíço	CCS	05° 33' 42.50"	37° 39' 38.70"
Caverna do Chocalho	CHO	05° 33' 36.77"	37° 39' 39.36"
Caverna da Descoberta	DBT	05° 33' 47.68"	37° 39' 55.50"
Caverna Geraldo Gusso	GEG	05° 33' 40.64"	37° 39' 50.45"

Tabela 2. Distribuição da fauna troglóbia do lajedo do Rosário nas diferentes cavernas e habitats amostrados. T: Terrestre; A: Aquático; E: Epicarste. Siglas das cavernas conforme Tabela 1.

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
	Ocheroceratidae 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								

### Estruturação genética de *K. troglobia*

Foram obtidas sequências parciais do *cox1* com 659 pb de 120 indivíduos de *Kinnapotiguara*, coletados em 19 cavernas (Tabela 3). Foram identificados 19 haplótipos, 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 (compartilhado entre cavernas do lajedo da Lapa) e Hap\_19 (compartilhado entre cavernas do lajedo dos Angicos) (Figura 3).

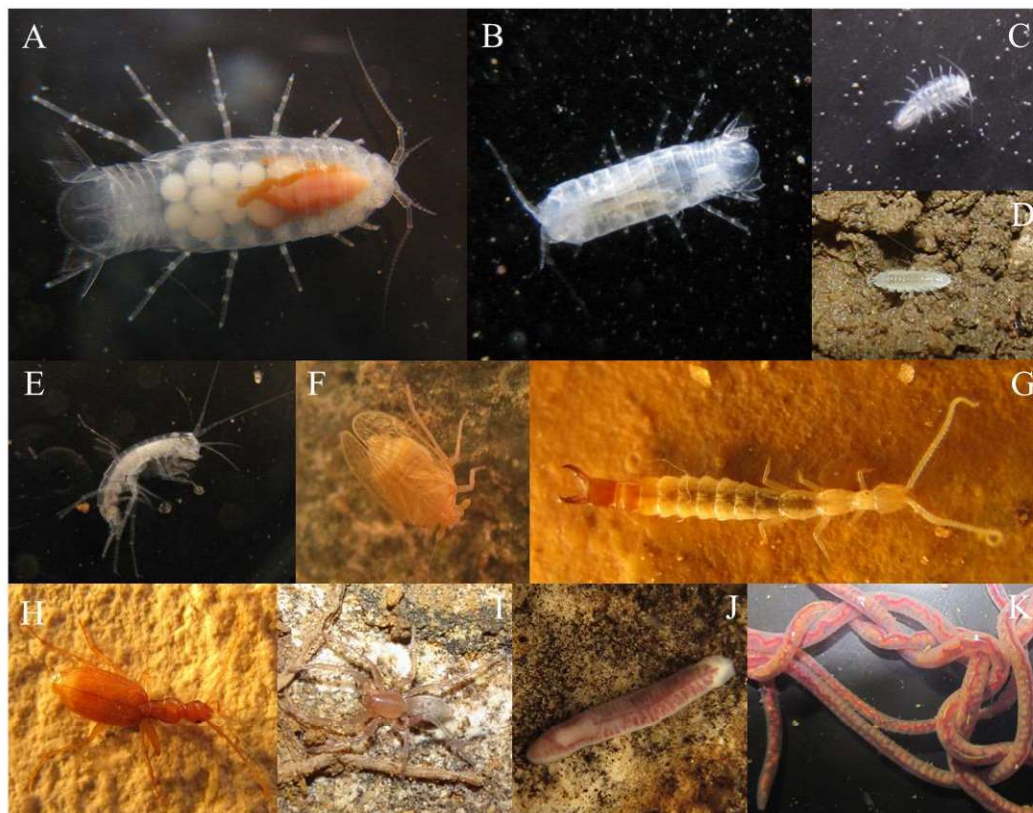


Figura 2: Algumas espécies troglóbicas que ocorrem no lajedo do Rosário: Cirolanidae sp. n1. (A), Cirolanidae sp. n2. (B), Calabozoidea (C), Styloniscidae sp. n. (D), *Potiberaba Porakuara* (E), *Kinnapotiguara troglobia* (F), Japygidae sp. n (G), Carabidae sp. n. (H), Prodidomidae sp. n (I), *Hausera hauseri* (J) e Oligochaeta sp. n (K).

Tabela 3. Relação das cavernas com ocorrência de *Kinnapotiguara*. N – número de indivíduos sequenciados. GDS Rosado, Governador Dix-Sept Rosado.

Caverna	Sigla	N	Afloramento (lajedo)	Município	Coordenadas	
					Latitude (S)	Longitude (O)
Gruta dos Troglóbios	TRO	11	Rosário	Felipe Guerra	05° 33' 24,27"	37° 39' 40,57"
Gruta dos Crotes	CRO	7	Rosário	Felipe Guerra	05° 33' 38,77"	37° 39' 31,54"
Gruta da Descoberta	DBT	9	Rosário	Felipe Guerra	05° 33' 47,68"	37° 39' 55,50"
Lapa I/Engano	LIE	6	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 41,89"	37° 41' 42,25"
Caverna Duas Urtigas	URT	2	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 35,48"	37° 41' 00,01"
Caverna da Raposa	RAP	2	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 36,15"	37° 41' 03,77"
Caverna Lapa I	LAI	8	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 35,50"	37° 41' 18,31"
Caverna do Mosteiro	MOS	6	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 45,61"	37° 41' 44,19"
Caverna Boa	CBO	2	Lapa	Felipe Guerra	05° 33' 59,50"	37° 41' 52,43"
Caverna dos dois	CDS	7	Alfredo	Felipe Guerra	05° 34' 06,51"	37° 40' 50,42"
Gruta da Rumana	RUM	10	Rumana	Felipe Guerra	05° 33' 54,25"	37° 39' 07,13"
Buraco Redondo	BRD	9	Meio	Felipe Guerra	05° 34' 42,98"	37° 39' 04,99"
Caverna da Seta	SET	7	Arapuá	Felipe Guerra	05° 32' 40,23"	37° 38' 03,10"
Caverna do Arapuá	ARA	9	Arapuá	Felipe Guerra	05° 31' 48,25"	37° 36' 58,47"
Caverna da Bota	BOT	7	Arapuá	Felipe Guerra	05° 31' 30,85"	37° 37' 05,29"
Gruta Boca de Peixe	BPX	8	Bonito	GDS Rosado	05° 29' 04,45"	37° 33' 29,62"
Gruta do Poço Feio	PFE	8	Bonito	GDS Rosado	05° 29' 15,51"	37° 33' 33,40"
Caverna SN9	SN9	1	Angicos	GDS Rosado	05° 29' 41,33"	37° 32' 41,71"
Caverna Sombra de Ubaia	SUB	1	Angicos	GDS Rosado	05° 29' 41,64"	37° 32' 41,23"

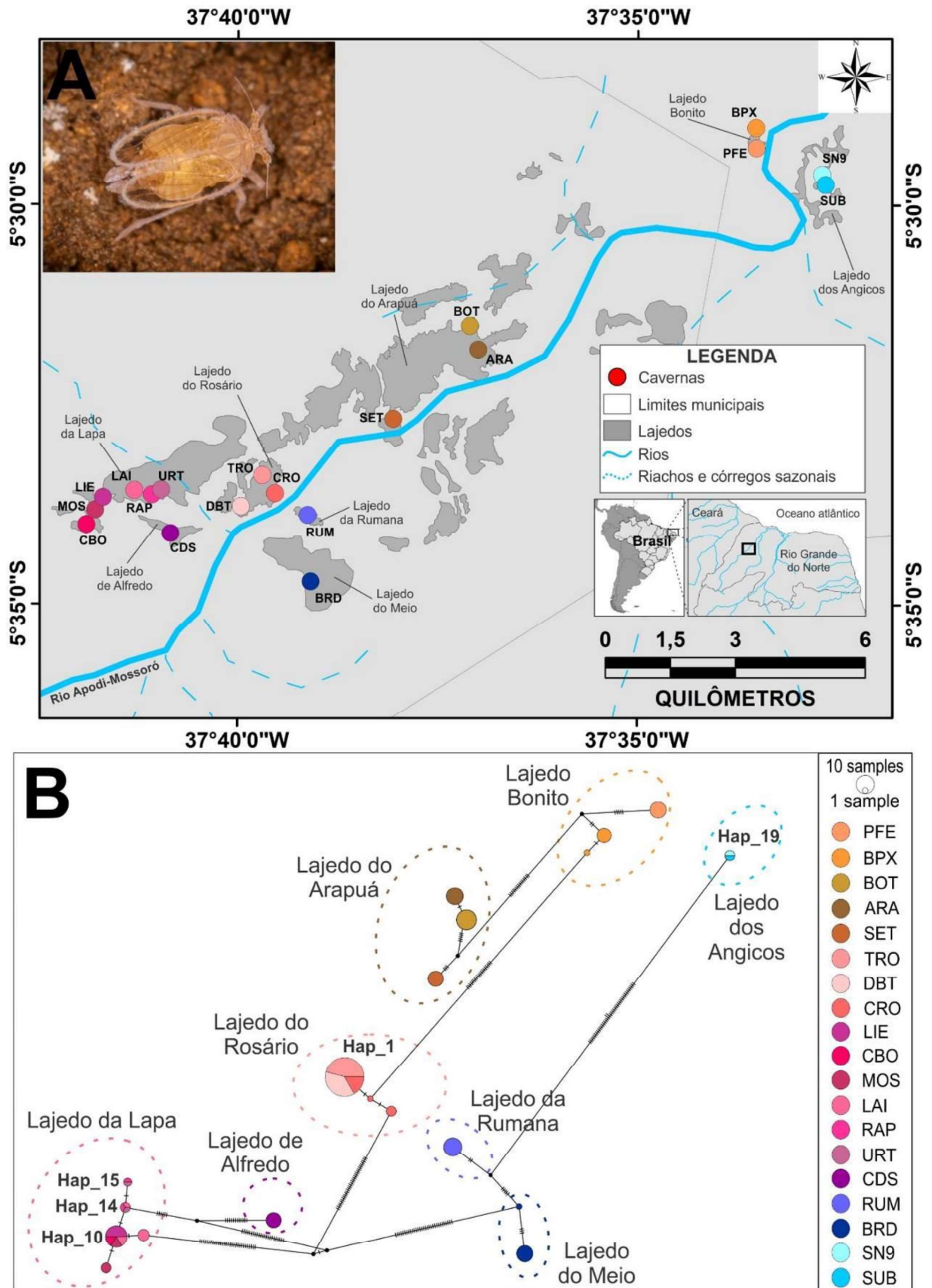


Figura 3: Localização das cavernas com ocorrência de *Kinnapotiguara* e indivíduos com Cox1 sequenciado (A), além de rede de haplótipos com os passos mutacionais inferidos (B). Siglas das cavernas em A de acordo com a Tabela 3.

As comparações par-a-par de  $\Phi_{ST}$ , em sua maioria iguais a 1.00 ou muito próximos, e significativos, apontam 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 cavernas do lajedo do Rosário (variando de 0, entre as cavernas da Descoberta, DBT, e a dos Troglóbios, TRO, a 0.35 entre esta e a caverna dos Crotos, CRO) e também no lajedo da Lapa (Tabela 4). Embora isso ocorra sempre entre cavernas próximas e em um mesmo afloramento, não foi observado entre outras localidades nas mesmas condições, como as cavernas do Arapuá (ARA) e Bota (BOT), no lajedo do Arapuá, e entre as cavernas da Boca de Peixe (BPX) e do Poço Feio (PFE), no lajedo Bonito.

Tabela 4. Valores de  $\Phi_{ST}$  para as sequências *cox1* (abaixo da diagonal) e distância linear (em km, acima da diagonal) entre as localidades de *Kinnapotiguara*. Siglas das cavernas conforme Tabela 3. \*  $p < 0.05$ . Os valores referentes às cavernas no lajedo do Rosário estão destacadas em negrito.

	TRO	CRO	DBT	BOT	ARA	SET	PFE	BPX	LIE	CBO	MOS	CDS	LAI	RAP	URT	RUM	BRD	SN9	SUB
<b>TRO</b>	-	<b>0.51</b>	<b>0.85</b>	5.91	5.80	3.29	13.6	13.9	3.78	4.20	3.86	2.51	3.03	2.59	2.47	1.38	2.65	14.6	14.6
<b>CRO</b>	<b>0.35</b>	-	<b>0.82</b>	5.94	5.77	3.23	13.6	13.9	4.05	4.41	4.11	2.60	3.31	2.86	2.74	0.88	2.15	14.5	14.5
<b>DBT</b>	<b>0.00</b>	<b>0.31</b>	-	6.72	6.57	4.04	14.4	14.7	3.28	3.61	3.34	1.78	2.57	2.12	2.01	1.51	2.31	15.4	15.4
BOT	1.00*	0.98*	1.00*	-	0.57	2.77	7.73	8.01	9.43	9.95	9.53	8.42	8.68	8.29	8.18	5.78	6.96	8.78	8.78
ARA	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	-	2.55	7.86	8.16	9.41	9.91	9.50	8.31	8.65	8.24	8.13	5.54	6.63	8.81	8.81
SET	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	-	10.4	10.7	7.01	7.47	7.09	5.79	7.00	5.82	5.70	3.01	4.22	11.3	11.3
PFE	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	-	0.36	17.1	17.7	17.2	16.1	17.1	16.0	15.9	13.4	14.3	1.78	1.79
BPX	0.99*	0.97*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.98*	-	17.4	17.9	17.5	16.4	16.7	16.0	16.2	13.7	14.6	1.86	7.88
LIE	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	-	0.62	0.13	1.76	0.76	1.20	1.31	4.79	5.19	18.2	18.2
CBO	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.00	-	0.50	1.92	1.28	1.66	1.77	5.09	5.32	18.7	18.7
MOS	0.99*	0.98*	0.99*	0.99*	1.00*	0.99*	1.00*	0.99*	0.60	0.40	-	1.77	0.85	1.28	1.39	4.84	5.21	18.3	18.3
CDS	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	0.99*	-	1.28	1.02	1.00	3.20	3.43	17.1	17.1
LAI	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.28	0.04	0.44*	0.97*	-	1.20	1.31	4.79	5.19	18.2	18.2
RAP	0.99*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	0.88*	0.67	0.71*	0.99*	0.43	-	0.12	3.63	4.19	17.1	17.1
URT	0.99*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	0.88*	0.67	0.71*	0.99*	0.43	-1.0	-	3.52	4.10	16.9	16.9
RUM	1.00*	0.98*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.99*	1.00*	1.00*	-	1.50	14.2	14.2
BRD	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	1.00*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.99*	0.97*	-	15.0	15.0
SN9	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.99	-	0.01
SUB	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.99	0.00	-

Segundo a AMOVA, o agrupamento das cavernas nos diferentes afloramentos calcários (lajedos) explica 94,94% da variação genética observada ( $\Phi_{CT} = 0.949$ ,  $p < 0.001$ ) (Tabela 5). O melhor cenário indicado pela SAMOVA (maior  $\Phi_{CT}$  significativo) 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). Tal arranjo manteve o agrupamento das cavernas no lajedo do Rosário em uma mesma população, e também no lajedo dos Angicos e em parte do lajedo da Lapa, mas apontou populações diferentes em cada uma das cavernas dos demais lajedos (Tabela 6).

Tabela 5. Teste de análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar quanto da variação genética observada nas sequências do *cox1* de *Kinnapotiguara* pode ser explicada pela distribuição das cavernas nos afloramentos calcários (conforme Tabela 2). \*  $p < 0.05$ .

Hipótese	Entre grupos	Entre populações, dentro dos grupos	Dentro das populações	$\Phi_{CT}$
Afloramentos (TRO+CRO+DBT / SET + ARA + BOT/ BPX+PFE / LIE+CBO+MOS+LAI+RAP+URT / CDS / RUM / BRD / SN9+SUB)	94,94	4.61	0.45	0.949*

Tabela 6. Teste de análise espacial de variância molecular (SAMOVA) para avaliar as subdivisões genéticas com diferentes números de populações ( $K = 2-18$ ) para as sequências do *cox1* de *Kinnapotiguara*. A linha destacada indica o melhor arranjo ( $k=12$ ). Abreviações das cavernas conforme Tabela 1. \*  $p < 0.05$ .

Nº de grupos (K)	Composição dos grupos	Entre grupos	Entre populações, dentro dos grupos	Dentro das populações	$\Phi_{CT}$
2	TRO+DBT+CRO+BOT+ARA+SET+PFE+BPX+LIE+CBO+MOS+LAI+ CDS+RAP+URT / RUM+BRD+SN9+SUB	48.8	50.88	032	0.488*
3	TRO+DBT+CRO+BOT+ARA+SET+PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI+ CDS+RAP+URT / RUM+BRD+SN9+SUB	76.7	22.95	0.35	0.767*
4	TRO+DBT+CRO+ PFE+BPX / BOT+ARA+SET / LIE+CBO+MOS+LAI+ CDS+RAP+URT / RUM+BRD+SN9+SUB	80.89	18.71	0.40	0.809*
5	TRO+DBT+CRO+ BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI+ CDS+RAP+URT / RUM+BRD / SN9+SUB	80.06	19.55	0.39	0.800*
6	TRO+DBT+CRO / BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI+ CDS+RAP+URT / RUM+BRD / SN9+SUB	89.47	10.11	0.42	0.895*
7	TRO+DBT+CRO / BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI +RAP+URT / CDS / RUM+BRD / SN9+SUB	93.38	6.20	0.43	0.934*
8	TRO+DBT+CRO / BOT+ARA / SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI +RAP+URT / CDS / RUM+BRD / SN9+SUB	89.27	10.30	0.43	0.893*
9	TRO+DBT+CRO / BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI / RAP+URT / CDS / RUM / BRD / SN9+SUB	94.85	4.71	0.44	0.949*
10	TRO+DBT / CRO / BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+CBO+MOS+LAI / RAP+URT / CDS / RUM / BRD / SN9+SUB	91.77	7.79	0.45	0.918*
11	TRO+CRO / DBT / BOT+ARA+SET / PFE / BPX / LIE+CBO+MOS+LAI / RAP+URT / CDS / RUM / BRD / SN9+SUB	95.18	4.36	0.46	0.952*
12	TRO+CRO+DBT / BOT / ARA / SET / PFE / BPX / LIE+CBO+MOS+LAI / RAP+URT / CDS / RUM / BRD / SN9+SUB	99.09	0.46	0.46	0.991*
13	TRO+CRO / DBT / BOT+ARA / SET / PFE / BPX / LIE+ MOS+LAI / CBO / RAP / URT / CDS / RUM+BRD / SN9+SUB	94.49	5.05	0.46	0.945*
14	TRO+CRO / DBT / BOT+ARA+SET / PFE+BPX / LIE+LAI / MOS / CBO / RAP / URT / CDS / RUM / BRD / SN9 / SUB	92.09	7.45	0.46	0.921*
15	TRO+DBT / CRO / BOT+ARA / SET / PFE+BPX / LIE+LAI / MOS / CBO / RAP / URT / CDS / RUM / BRD / SN9 / SUB	95.74	3.80	0.47	0.957*
16	TRO+DBT / CRO / BOT / ARA / SET / PFE / BPX / LIE+CBO / MOS / LAI / RAP / URT/CDS / RUM / BRD / SN9+SUB	98.89	0.63	0.48	0.989*
17	TRO / DBT / CRO / BOT+ARA / SET / PFE / BPX / LIE+LAI / MOS / CBO / RAP / URT / CDS / RUM / BRD / SN9 / SUB	98.25	1.28	0.48	0.982*
18	TRO+DBT / CRO / BOT / ARA / SET / PFE / BPX / LIE / LAI / MOS / CBO / RAP / URT / CDS / RUM / BRD / SN9 / SUB	98.87	0.65	0.48	0.989*

A inferência bayesiana da estrutura genética de populações, implementada no BAPS 5.2 para os lajedos com mais de uma localidade, indicou três agrupamentos para *K. troglobia* no lajedo do Rosário (probabilidade = 1,  $\log(\text{ml}) = -7.68$ ). No entanto, dois desses agrupamentos são constituídos por indivíduos coletados na caverna dos Crotos, enquanto o terceiro agrupamento é formado por indivíduos de todas as três localidades (Tabela 7, Figura 4). Os agrupamentos delimitados para os demais lajedos são, de maneira geral, coerentes com os padrões identificados pelas redes de haplótipos e SAMOVA (Tabela 7, Figura 4).

Tabela 7. Inferência bayesiana da estrutura genética de populações (BAPS) para subdivisões genéticas em diferentes números de populações para o *cox1* de *Kinnapotiguara*, realizada para os lajedos com mais de uma caverna com ocorrência do táxon. Tendo em vista a coleta de apenas um indivíduo em cada uma das duas localidades, e os mesmos compartilharem o mesmo haplótipo, não foi realizada a análise no BAPS para o lajedo dos Angicos (cavernas SN9 e SUB). Siglas das cavernas de acordo com a Tabela 3.

Nº de grupos (K)	Composição dos grupos	Lajedo	Probabilidade	Log (ml)
3	TRO + DBT + CRO CRO CRO	Rosário	1	-7.68
2	PFE BPX	Bonito	0.99	-28.75
2	BOT + ARA SET	Arapuá	0.71	-42.39
5	LIE + CBO + MOS + LAI LAI + RAP + URT LAI MOS RAP + URT	Lapa	0.93	-26.78

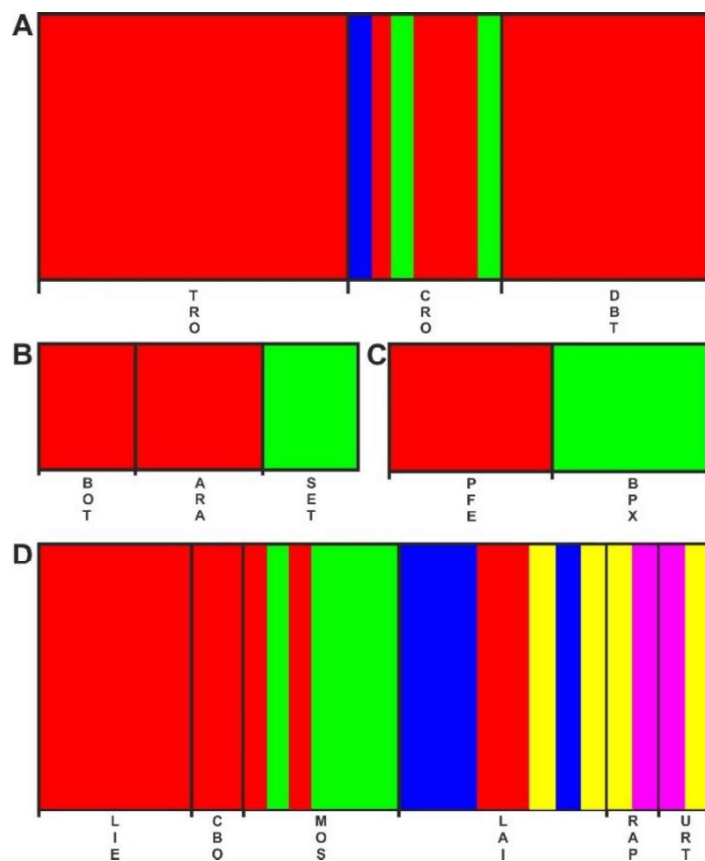


Figura 4. Atribuição bayesiana para cada indivíduo inferida pelo programa BAPS para *Kinnapotiguara*, realizada para os lajedos com mais de uma caverna com ocorrência da espécie (A – lajedo do Rosário, B – lajedo do Arapuá, C – lajedo Bonito, D – lajedo da Lapa). As linhas verticais indicam cada um dos indivíduos e as cores representam o coeficiente de associação de probabilidade daquele indivíduo para cada agrupamento genético. Siglas das cavernas de acordo com a Tabela 3.

## DISCUSSÃO

### Fauna troglóbia do lajedo do Rosário

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).

Um dos motivos para tal concentração pode ser o grande número de cavernas no lajedo (73 até o momento, CECAV/CANIE, 2020). O número de cavernas é um preditor da riqueza de troglóbios mais efetivo do que a área cárstica total (Christman e Culver, 2001), sugerindo que, embora os ambientes subterrâneos intermediários possam ser importantes para a conectividade, as cavernas ainda são um fator dominante para a diversidade de espécies troglóbias (Balogh et al., 2020).

Outro fator determinante seria a presença de aquíferos e outras coleções de águas subterrâneas nas cavernas do lajedo do Rosário, frequentemente apontada como um importante fator para a alta diversidade de troglóbios (Culver e Sket, 2000; Culver e Pipan, 2009; 2013; Simões et al., 2015). Como exemplos no Brasil, as duas áreas com maior riqueza de troglóbios na Mata Atlântica, o quadrilátero ferrífero (Minas Gerais) e o grupo Açungui (São Paulo e Paraná) são importantes aquíferos (Souza-Silva et al., 2015), e o mesmo ocorre na área cárstica da Serra da Bodoquena, no Sudoeste do Brasil, uma região com grande diversidade de troglóbios e estigóbios (Cordeiro et al., 2014).

Dessa forma, as grandes concentrações de troglóbios geralmente estão associadas à presença de corpos d'água e/ou córregos e rios subterrâneos (Souza-Silva e Ferreira, 2016; Souza-Silva et al., 2017), cuja presença é ainda mais determinante nas regiões semiáridas (Souza-Silva e Ferreira, 2016). Tais coleções aumentam a umidade e importam matéria orgânica (Souza-Silva et al., 2012) e, além de permitir a colonização e manutenção de estigóbios, podem proporcionar maior riqueza de troglóbios terrestres (Simões et al., 2015). Além de possuir as características acima citadas, as cavernas no lajedo do Rosário não estão sujeitas a inundações (Bento et al., 2016). Tais eventos podem causar distúrbios no aporte de nutrientes e no fluxo de indivíduos que entram e saem das cavernas, aumentando o fluxo gênico e dificultando a especiação (Souza-Silva et al., 2011; Simões et al., 2015), de forma que

cavernas sujeitas a inundações extremas geralmente não apresentam muitas espécies troglóbias (Elliott, 2004).

Além disso, quatro das nove espécies estigóbias identificadas no lajedo do Rosário são relictos oceânicos (cirolanídeos e anfípodas - Ferreira et al., 2010; Fisër et al., 2013). Em regiões costeiras, avanços e regressões oceânicas ocorridos em diferentes períodos têm sido apontadas como responsáveis pela origem de diversas linhagens de estigóbios considerados relictos oceânicos (Fisër et al., 2013; Alvarez et al., 2015; Souza et al., 2018; Humphreys, 2019; Delic et al., 2020). A área de estudo tem um histórico de transgressões e regressões oceânicas, com vastos registros geológicos e paleontológicos (Bezerra et al., 2007; Rosseti et al., 2013; Bagni et al., 2020), além de uma comunidade de estigóbios relictos oceânicos como testemunhos (Ferreira et al., 2010; Fisër et al., 2013; Souza et al., 2018).

Assim, a riqueza e a singularidade biológica da fauna subterrânea no lajedo do Rosário, com destaque para a quantidade e concentração de troglóbios, além da presença de relictos, provavelmente resulta de uma combinação de fatores geológicos, hidrogeológicos e paleoclimáticos única no Brasil.

#### **Lajedo do Rosário: habitat subterrâneo contínuo**

A AMOVA indicou que o agrupamento das cavernas nos diferentes lajedos explicou 94.94% da variação genética observada em *K. troglobia*. No entanto, o melhor cenário indicado pela SAMOVA (k=12) aponta que a maioria das populações está confinada a uma única caverna, mesmo quando estas ocorrem em um mesmo lajedo. Isso está de acordo com a rede de haplótipos, que indicou que 14 dos 19 haplótipos são exclusivos das cavernas onde ocorrem, bem como com a estruturação populacional extrema revelada por valores elevados e significativos de  $\Phi_{ST}$  entre a maioria das localidades. Esse padrão, no entanto, parece frequente entre organismos subterrâneos terrestres, e na ausência de conectividade é esperada divergência extrema entre as populações de diferentes cavernas (Mammola et al., 2015; Balogh et al., 2020).

No lajedo do Rosário, no entanto, ocorrem três haplótipos e o mais comum é compartilhado entre indivíduos das três cavernas (Hap\_1). A SAMOVA indicou que os indivíduos coletados nessas três cavernas pertencem a uma única população, e também não houve valores elevados e significativos de  $\Phi_{ST}$  entre nenhuma das cavernas no lajedo (chegou a 0 entre indivíduos coletados nas cavernas da Descoberta e dos Troglóbios, cuja sequência do *cox1* é idêntica, apesar da distância de 850 metros entre elas). A inferência bayesiana, realizada no BAPS, embora tenha indicado três agrupamentos genéticos no lajedo do Rosário, apontou um agrupamento composto por indivíduos das três cavernas.

Todos esses resultados sugerem um provável fluxo de indivíduos/genético de *K. troglobia* entre as cavernas do lajedo do Rosário. A existência de uma rede de espaços subterrâneos poderia manter a disponibilidade de habitat e a conectividade entre cavernas em escala local (Mammola et al., 2016; Pipan e Culver, 2017), o que explicaria o padrão filogeográfico contrastante encontrado entre o lajedo do Rosário e a maioria das demais localidades de *Kinnapotiguara*. De fato, além das 73 cavernas atualmente conhecidas no lajedo do Rosário (CECAV/CANIE, 2020), das quais apenas 25 estão mapeadas, há ainda uma enorme concentração de outras cavidades geradas pela dissolução cárstica. São 241 dolinas, 98 uvalas (dolinas colmatadas), 219 sumidouros e 724 condutos horizontais (vales cársticos, alguns chegando a mais de 150 metros), sendo que todas estas estruturas cársticas têm correlação geométrica e espacial com fraturas interconectadas, as feições estruturais mais comuns no lajedo (Carneiro et al., 2015).

Tendo em vista esse padrão filogeográfico contrastante observado para *K. troglobia*, 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 e Karmann, 2008; Trajano, 2007; Souza-Silva et al., 2016).

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região oeste da Formação Jandaíra é uma das mais relevantes do ponto de vista bioespeleológico no Brasil, com riqueza e diversidade comparáveis às demais regiões cársticas brasileiras. Destaca-se pela quantidade e concentração de espécies troglóbias, incluindo os únicos relictos oceânicos no país, associada à presença de aquíferos cársticos e mudanças paleoclimáticas (incluindo transgressões e regressões oceânicas) (Bento et al., 2021).

Destaca-se a área cárstica dos municípios de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado, e mais especificamente o lajedo do Rosário, em Felipe guerra, que pode ser considerado um *hotspot* de biodiversidade subterrânea. É importante frisar ainda que, conforme resultados do Capítulo II, o lajedo do Rosário concentra parte considerável das linhagens crípticas identificadas e está inserido na principal área prioritária para conservação. 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).

Os resultados trazem ainda outras grandes implicações para a conservação do patrimônio espeleológico da área de estudo. 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 (Brasil, 2008; MMA, 2017). Tal legislação 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 é apenas o terceiro *hotspot* de biodiversidade subterrânea identificado no Brasil e em toda a América do sul. Apesar dessa singularidade, não há na legislação ambiental brasileira qualquer garantia expressa de proteção específica para tais cavernas ou sistemas de cavernas únicos. É recomendável, portanto, o aperfeiçoamento de tal legislação de forma a garantir proteção integral aos *hotspots* de biodiversidade subterrânea e seu entorno.

A criação de uma Unidade de Conservação com foco na proteção de uma importante concentração de cavernas na região oeste do Rio Grande do Norte, o Parque Nacional da Furna

Feia (Brasil, 2012), representou um importante ganho para a conservação do patrimônio espeleológico potiguar. No entanto, o lajedo do Rosário permanece fora de áreas protegidas. Além disso, o conceito de hotspots de biodiversidade subterrânea é criticado por adotar um limite arbitrário de 20 espécies troglóbias, além de não considerar ameaças à perda de biodiversidade, como no conceito original de hotspot proposto por Myers et al. (2000) (Souza-Silva e Ferreira, 2016). O lajedo do Rosário, no entanto, 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). Isso denota a necessidade urgente de ações voltadas à criação de uma Unidade de Conservação na área.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6):711–728.
- Alvarez F, Iliffe TM, Benitez S, Brankovits D, Villalobos JL (2015) New records of anchialine fauna from the Yucatan Peninsula. **Mexico Check List** 11(1): 1505. <https://doi.org/10.15560/11.1.1505>.
- Araújo VFP, Bandeira AG, Vasconcellos A (2010) Abundance and stratification of soil macroarthropods in a Caatinga Forest in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology** 70(3):737–746. doi:10.1590/S1519-69842010000400006.
- Ázara LN, Ferreira RL (2014) Two new troglobitic *Newportia* (*Newportia*) from Brazil (Chilopoda: Scolopendromorpha). **Zootaxa** 3881 (3): 267–278.
- Bagni, F. L., Bezerra, F. H., Balsamo, F., Maia, R. P., & Dall'Aglio, M. (2020). Karst dissolution along fracture corridors in an anticline hinge, Jandaíra Formation, Brazil: Implications for reservoir quality. **Marine and Petroleum Geology** 115, 104249. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2020.104249>.
- Balogh A, Ngo L, Zigler KS, Dixon G (2020) Population genomics in two cave-obligate invertebrates confirms extremely limited dispersal between caves. **Scientific reports** 10(1): 1–11.
- 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. **Biodiversity and Conservation**. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>.
- Bertani RT, Costa IG, Matos, RMD (1990) Evolução tectono-sedimentar, estilo estrutural e habitat do petróleo na Bacia Potiguar. In Raja-Gabaglia GP & Milani EJ (Coords.), **Origem e evolução de bacias sedimentares**. Rio de Janeiro: PETROBRAS, Editora Gávea, p. 291-310, 1990.
- Bezerra FHR, Takeya MK, Sousa MOL, Nascimento AF (2007) Coseismic reactivation of the Samambaia fault, Brazil. **Tectonophysics** 430: 27–39.
- Brasil. Decreto n. 6.640, de 7 de Novembro de 2008. Dá nova redação aos arts. 1º, 2º, 3º, 4º e 5º e acrescenta os arts. 5-A e 5-B ao Decreto nº 99.556, de 1º de outubro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 nov. 2008. Seção 1.
- Brasil. Decreto de 5 de junho de 2012. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional da Furna Feia, nos municípios de Baraúna e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jun. 2012.
- CANIE/CECAV (2020) **Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>. Acesso em 30 dez. 2021.
- Cardoso, R. C., Ferreira, R. L., & Souza-Silva, M. (2021). Priorities for cave fauna conservation in the Iuiu karst landscape, northeastern Brazil: a threatened spot of troglobitic species diversity. **Biodiversity and Conservation**, 30(5), 1433-1455.

- 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.
- Chertoprud ES, Palatov DM, Borisov RR, Marinskiy VV, Bizin MS, Dbar RS (2016) Distribution and a comparative analysis of the aquatic invertebrate fauna in caves of the western Caucasus. **Subterranean Biology** 18: 49–70. doi: 10.3897/subtbiol.18.8648.
- Christiansen K (2005) Morphological adaptations. In: Culver DC, White W (eds) **Encyclopedia of caves**. Elsevier Academic Press, USA, pp 386–397.
- Christman MC, & Culver DC (2001) The relationship between cave biodiversity and available habitat. **Journal of Biogeography** 28(3): 367-380.
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D, & Crandall K (2002) TCS: estimating gene genealogies. In Parallel and Distributed Processing Symposium, International (Vol. 2, pp. 0184-0184).
- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences** 205:19-31. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2006.09.015>.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics** 9:539. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-539>.
- Cordeiro LM, Borguezan R, Trajano E (2014) Subterranean biodiversity in the Serra da Bodoquena karst area, Paraguay river basin, Mato Grosso do Sul, Southwestern Brazil. **Biota Neotropica** 14(3):1–28.
- 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.
- Culver DC (1982) **Cave life, evolution and ecology**. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Culver DC (2001) Subterranean ecosystems. In: Levin SA (ed) **Encyclopaedia of biodiversity**, vol 5. Academic Press, San Diego, pp 527–540.
- Culver DC, Pipan T (2009) **The biology of caves and other subterranean habitats**. Library of Congress Cataloging in Publication Data, Oxford University Press, Oxford.
- Culver DC, Pipan T (2013) Subterranean Ecosystems. In: Levin SA (Ed.) **Encyclopedia of Biodiversity** (2nd edition). Volume 7, Academic Press, Waltham, 49–62. doi: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00224-0.
- Culver DC, Sket B (2000) Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. **Journal of Cave and Karst Studies** 62: 11–17.
- Delić T, Stoch F, Borko Š, Flot JF, Fišer C (2020) How did subterranean amphipods cross the Adriatic Sea? Phylogenetic evidence for dispersal–vicariance interplay mediated by marine regression–transgression cycles. **Journal of Biogeography** 47(9): 1875-1887.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology** 11(12): 2571-2581.
- Elliott WR (2004) Protecting caves and cave life. In: Culver DC, White WB (Eds) **Encyclopedia of caves**. Elsevier Academic Press, San Diego, 458–467.

Ernesto MV, Liberal CN, Ferreira AS, Alves ACF, Zeppelini D, Martins CF, ... & Vasconcellos A (2018) Hexapod decomposers of Serra de Santa Catarina, Paraíba, Brazil: an area with high potential for conservation of Caatinga biodiversity. **Biota Neotropica**, 18(2). <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0410>.

Excoffier L, Lischer HL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10 (3): 564-567.

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, Martins RP, Prous X (2007) Structure of bat guano communities in a dry Brazilian cave. **Tropical Zoology** 20(1):55-74.

Ferreira RL, Prous X, Bernardi LFO, Souza-Silva M (2010) Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e impactos. **Rev. Bras. Espeleol.** 1: 25-51.

Ferreira AS, Bellini BC, Vasconcellos A (2013) Temporal variations of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) in the semiarid Caatinga in northeastern Brazil. **Zoologia** 30: 639-644. DOI: 10.1590/S1984-46702013005000009.

Fisër C, Zagamajster 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.

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): 294-9.

Gallão JE, Bichuette ME (2015) Taxonomic distinctness and conservation of a new high biodiversity subterranean area in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 87(1): 209–217. doi: 10.1590/0001-3765201520140312.

Gilbert J, Deharveng L (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. **BioScience** 52:473–481.

Glanville K, Schulz C, Tomlinson M, Butler D (2016) Biodiversity and biogeography of groundwater invertebrates in Queensland, Australia. **Subterranean Biology** 17: 55–76. doi: 10.3897/subtbiol.17.7542.

Hoch H, Ferreira RL (2013) *Potiguara troglobia* gen. n., sp. n.—first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). **Dtsch Entomol Z** 60(1)33–40.

Holsinger JR, Culver DC (1988) **The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of eastern Tennessee: zoogeography and ecology**. North Carolina: State Museum of Natural Sciences, 164p.

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

Humphreys WF (2019) Biodiversity patterns in Australia. 109-126. In: White WB and Culver DC (eds), **Encyclopedia of Caves**, 3rd Edition. Academic Press, San Diego.

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\\_o\\_2018.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/Areas_Prioritarias_Patrimonio_Espeleologico_o_2018.pdf) >. Acesso em: 20 Jan. 2021.

- 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, Bouiilon 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. **Molecular Biology and Evolution** 35(6): 1547-1549.
- 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.
- Leigh JW, Bryant D (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** 6 (9): 1110-1116.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25(11): 1451-1452.
- 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, Jones A, Barberis M, Badino G, & Isaia M (2016) Ecology and sampling techniques of an understudied subterranean habitat: the Milieu Souterrain Superficiel (MSS). **The Science of Nature** 103(11-12), 88.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente (2017) Instrução Normativa n° 02 de 30 de agosto de 2017. Define a metodologia para a classificação do grau de relevância das cavidades naturais subterrâneas, conforme previsto no art. 5° do Decreto n° 99.556, de 1° de outubro de 1990.
- 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
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA, & Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403(6772): 853-858.
- 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>.
- Prado D (2003) As caatingas da América do Sul. In: Leal IR, Tabarelli M, & Silva JMC (eds.) **Ecologia e conservação da Caatinga**. pp. 3-73. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Rosseti DF, Bezerra FHR, Dominguez JML (2013) Late Oligocene–Miocene transgressions along the equatorial and eastern margins of Brazil. **Earth-Science Reviews** 123:87-112.
- Sánchez LE (1992) O sistema: unidade lógica de referência nos estudos espeleológicos. **Espeleo-Tema** 16: 3-14.
- Silva JMC, Tabarelli M, Fonseca MT, Lins L (2004) **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

- Simões MH, Souza-Silva M, Ferreira EL (2015) Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics. **Subterranean Biology** 16: 103–121. doi:10.3897/subtbiol.16.5470.
- 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-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. doi: 10.1007/s10531-011-0057-5.
- Souza-Silva M, Bernardi LFO, Martins RP, Ferreira RL (2012) Transport and consumption of organic detritus in a neotropical limestone cave. **Acta Carsologica** 41: 139–150. doi: 10.3986/ac.v41i1.54.
- Souza-Silva M, Martins RP, Ferreira RL (2015) Cave Conservation Priority Index to Adopt a Rapid Protection Strategy: A Case Study in Brazilian Atlantic Rain Forest. **Environmental Management** 55: 279–295. doi: 10.1007/s00267-014-0414-8.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- Trajano E (2007) **Sistema Areias. 100 anos de estudos**. São Paulo: Redespeleo Brasil. 128p.
- Trajano E, Gallão JE, Bichuette ME (2016) Spots of high diversity of troglobites in Brazil: the challenge of measuring subterranean diversity. **Biodiversity and Conservation**, 25(10): 1805-1828.
- Vasconcellos A, Andreazze R, Almeida AM, Araújo HFP, Oliveira ES, Oliveira U (2010) Seasonality of insects in the semi-arid Caatinga of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 54(3): 471–476.
- 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.
- Xia X (2018) DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular biology and Evolution** 35(6): 1550-1552.

## CAPÍTULO IV

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

*Vida nas CaveRNas: proposed booklet as a  
tool for environmental education and didactic  
material in Science teaching*



## **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, 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 antrópicos frequentemente 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 negativamente atividades humanas. Também são apresentadas soluções para esses impactos, destacando que é possível e desejável 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 na cartilha. 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 na região oeste do Rio Grande do Norte. 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.

**Palavras Chave:** Biologia Subterrânea, Conservação, Patrimônio Espeleológico, Troglóbios

## **ABSTRACT**

Due to their intrinsic fragilities, caves and their associated biodiversity are differentially exposed to impacts arising from anthropic activities. Although environmental education is important in the formation of conscientious citizens, actions focused on communities around caves are still relatively uncommon. In this context, subterranean biology can help environmental education in the dissemination and valuation of one of the lesser known habitats, which are caves. We present the educational booklet “Vida nas caveRNas”, focusing on cave fauna in the west of Rio Grande do Norte state, particularly endemic troglobitic species and their evolutionary history. The material also addresses general characteristics of the Caatinga and other species often found in caves, their ecological relationships and the anthropogenic impacts often observed in the region. Impacts are addressed not only in relation to their effects on the subterranean environment, but also to surface environments that can even negatively affect human activities. Solutions for these impacts are also presented, highlighting that it is possible and desirable to reconcile human activities and the conservation of speleological heritage. In addition, there is information about the species that inspired the characters and some playful activities, with the aim of fixing the knowledge presented in the booklet. The booklet was developed as an educational strategy to assist in the teaching-learning process of the Science discipline in the final years of elementary school, as well as in other environmental education actions, in order to arouse interest in the caves, their inhabitants and their conservation. Its adoption, mainly in a continuous environmental education strategy, will certainly help in the conservation of the exceptional speleological heritage existing in the west region of Rio Grande do Norte state. Finally, we recommend the elaboration of didactical materials based on regional and even local contexts, and the model presented here can be followed for the elaboration of booklets aimed at other specific regions of Brazil. However, such materials must be prepared responsibly and carefully, in addition to being based on extensive scientific knowledge.

**Key Words:** Underground Biology, Conservation, Speleological Heritage, Troglobites.

## INTRODUÇÃO

Os ambientes subterrâneos (dos quais as cavernas fazem parte) e sua biodiversidade associada são frequentemente expostos a diversos impactos oriundos de atividades antrópicas (Ferreira e Martins, 2001; Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Mammola et al., 2019). Atividades agropastoris, urbanização e mineração tem sido as mais recorrentes no entorno de cavernas, entretanto o uso recreativo e atividades turísticas têm sido comuns em seu interior (Souza-Silva et al., 2015).

Embora os ambientes de superfície sejam diretamente afetados, os impactos antrópicos tendem a ser até mais intensos nos habitats subterrâneos, que juntamente com sua fauna apresentam vulnerabilidade intrínseca (Mammola et al., 2019). Isso ocorre devido à maioria das espécies troglóbias (exclusivamente subterrâneas) necessitarem de condições ambientais específicas (temperatura relativamente constante e umidade elevada), possuírem distribuição restrita (Gilbert e Deharveng, 2002; Trontelj et al., 2009), crescimento populacional lento e baixa fecundidade (Fišer et al., 2013), resultando em comunidades menos resilientes e mais vulneráveis a perturbações ambientais (Cardoso et al., 2010; Mammola et al., 2019).

Devido a tais características, os ambientes subterrâneos abrigam formas de vida excepcionais e devem ser considerados habitats críticos e priorizados em políticas de conservação (Mammola et al., 2019). No entanto, embora iniciativas de identificação e priorização de áreas objetivando a conservação de cavernas no Brasil tenham se tornado mais frequentes (Ferreira, 2005; Simões et al., 2014; ICMBio/CECAV, 2018; Rabelo et al., 2018; Cardoso et al., 2021), ações de educação ambiental focadas nas comunidades no entorno de áreas com ocorrência do patrimônio espeleológico ainda são relativamente incomuns.

Isso é preocupante, pois a educação ambiental é uma importante prática para a formação de cidadãos conscientes das necessidades de conservação e mitigação de impactos em cavernas (Dias, 2004; Ferreira et al., 2008). Nesse contexto, a biologia subterrânea pode auxiliar o trabalho da educação ambiental, seja formal ou informalmente (Donato e Dantas, 2009; Donato e Oliveira, 2019). Além disso, ao se divulgar um dos habitats menos conhecidos da população geral, que são as cavernas, pode-se aumentar o conhecimento e a conscientização sobre a sua importância junto a um público mais amplo que os espeleólogos e pesquisadores (Donato e Oliveira, 2019).

Os benefícios dessa estratégia são inúmeros, como utilizar espécies bandeiras (ou guarda-chuvas) para potencializar a conservação do ambiente onde estão, pelo carisma que possuem; divulgar a presença de fauna endêmica e rara, como os troglóbios, e seu potencial

para estudos genéticos, ecológicos e evolutivos; permitir o estudo de interações ecológicas únicas (que geralmente não ocorrem em ambientes superficiais); associar a presença de fósseis e vestígios arqueológicos e paleontológicos nas cavernas, que podem auxiliar na compreensão da evolução da região; e contribuir para diminuir os impactos ambientais sobre as cavernas e seus entornos (Donato, 2018; Donato e Oliveira, 2019).

Adicionalmente, tais iniciativas podem auxiliar a mudar a percepção ambiental negativa sobre determinados ambientes e espécies animais menos carismáticas (Cardoso et al., 2011; D'Amen et al., 2013; Silva et al., 2018; Nascimento et al., 2020). Isso é particularmente válido para cavernas e invertebrados, principalmente na Caatinga, que são pouco explorados no currículo escolar (Nascimento et al., 2020). As escolas e os livros didáticos não contribuem para melhorar essa percepção, já que geralmente abordam tais espécies e ambientes sob uma ótica antropocrista (Trindade et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Nascimento et al., 2020). Mesmo no Estado de Minas Gerais, que concentra quase metade das mais de 21.000 cavernas oficialmente cadastradas no Brasil (CANIE/CECAV, 2021), os livros didáticos de ensino fundamental abordam o tema cavernas de forma simplista e utilitária, citando apenas sua importância econômica, devido à extração de calcário, por exemplo (Ferreira et al., 2014).

Apesar disso, a escola tem se mostrado um ambiente propício para reflexão e construção de novos conhecimentos e percepções a respeito do ambiente (Silva et al., 2010). O desafio é incentivar a avaliação crítica do livro didático e a busca de fontes adicionais de pesquisas pelos docentes (Ferreira et al., 2014; Nascimento et al., 2020), já que os livros didáticos utilizados no ensino de Ciências possuem abordagem limitada a respeito de espécies nativas da Caatinga (Diniz et al., 2016; Barbosa e Ramos, 2020). Assim, torna-se necessário contextualizar o ensino de Ciências de forma a valorizar a fauna de invertebrados (Nascimento et al., 2020) e também o patrimônio espeleológico, ao menos nas regiões de ocorrência expressiva (Van-Beynen et al., 2012). O ensino de diversas disciplinas dos ensinos Fundamental e Médio pode ser beneficiado com associações extraídas do ambiente cavernícola, tais como biologia, química, geografia, física, etc. (Morgado et al., 1996), e as possibilidades de uso de cavernas em práticas de Ciências são amplas e facilitadas pela curiosidade despertada por esses ambientes (Souza-Silva et al., 2014).

Nesse contexto, torna-se necessária a elaboração de materiais para o ensino e divulgação sobre cavernas e seu uso sustentável (Ferreira et al., 2008). Cartilhas podem facilitar o processo de ensino-aprendizagem sobre o ambiente cavernícola, pois podem reunir e reforçar informações de outras fontes, permitindo a adaptação do conteúdo para diferentes públicos-

alvo e sua disponibilização em formatos impresso ou digital (Souza-Silva et al., 2014, Donato e Oliveira, 2019).

Essa versatilidade tem tornado as cartilhas uma ferramenta comum para a divulgação sobre o patrimônio espeleológico, e diversos materiais foram confeccionados e direcionados a públicos distintos: o “Almanaque da Turma do Dinho” (IBAMA/CECAV, 2004); a “Aventura da vida nas cavernas” (Ferreira et al., 2008), com foco na fauna cavernícola e impactos ao ambiente subterrâneo; “Viajando pelas cavernas da Serra do Espinhaço” (Alt e Moura, 2014); “Protegendo as cavernas do Brasil” (Donato et al., 2018), com foco na divulgação da legislação brasileira sobre o patrimônio espeleológico; e as cartilhas “O que é caverna? Desmistificação e aspectos físicos de uma caverna” (EGRIC, 2021a) e “O que é espeleologia? Espeleologia como ciência e sua história” (EGRIC, 2021b), direcionadas ao público geral e voltadas à apresentação de conceitos básicos e da história da espeleologia.

No entanto, com exceção da cartilha “Aventura da vida nas cavernas” (Ferreira et al., 2008), a biodiversidade subterrânea e os possíveis impactos ambientais que a afetam não são devidamente abordados. Também não há, atualmente, material didático direcionado à divulgação da biodiversidade subterrânea do oeste da formação Jandaíra, uma das áreas de maior relevância bioespeleológica no Brasil (Bento et al., 2021). Nesse contexto, apresentamos aqui 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.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

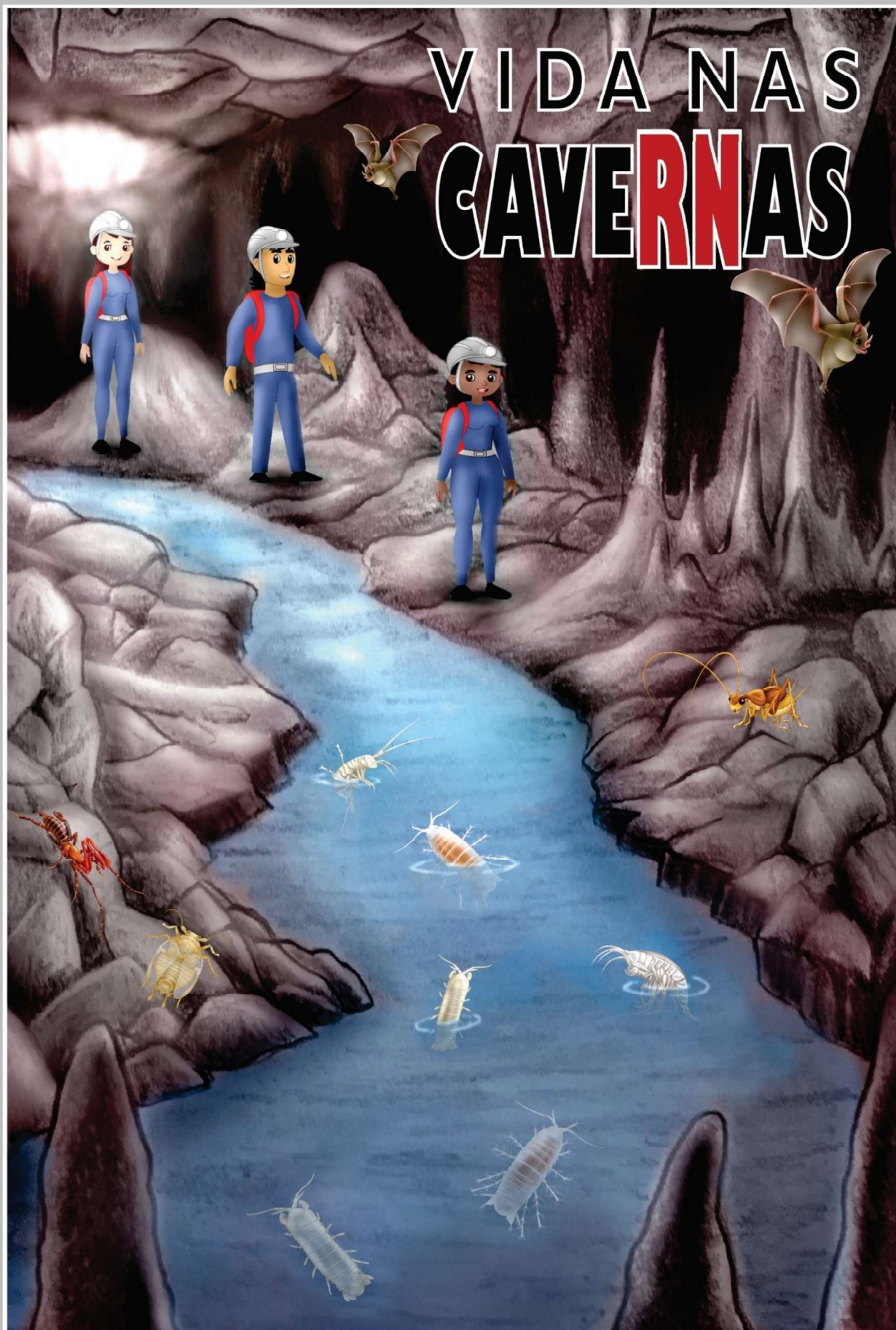
A cartilha ilustrada foi elaborada a partir da compilação de informações resultantes de diversos estudos com fauna subterrânea no oeste do Rio Grande do Norte, incluindo inventários e estudos ecológicos (Ferreira et al., 2010; Bento et al., 2016; Bento et al., 2021) e artigos de descrição das espécies (Hoch e Ferreira, 2013; Fisër et al., 2013; Santos et al., 2013; Castro-Souza et al., 2017). Tais informações foram complementadas com os resultados dos capítulos I e II, particularmente a história evolutiva, distribuição geográfica e impactos ao ambiente subterrâneo. De forma a ampliar seu escopo e a contextualização da história, são apresentadas também características gerais da Caatinga e utilizadas outras espécies frequentemente

encontradas nas cavernas, suas relações ecológicas e os impactos decorrentes de atividades humanas frequentemente observados na região.

Os impactos são abordados não só em relação a seus efeitos sobre o ambiente subterrâneo e seus habitantes, como também aos ambientes superficiais e que podem até mesmo afetar negativamente atividades humanas. Também são apresentadas soluções para esses impactos, destacando que é possível e desejável a conciliação entre atividades humanas e a conservação do patrimônio espeleológico.

A história foi elaborada de forma a permitir uma continuação, com possível elaboração de outras cartilhas com novas histórias baseadas nos resultados de outras pesquisas em andamento.

Além da história em quadrinhos, a cartilha traz informações sobre as espécies que inspiraram os personagens e algumas atividades lúdicas, com o objetivo de fixar o conhecimento apresentado na cartilha.



GIOVANNA (GIGI), LETÍCIA (LELÊ) E GERALDO (PENINHA) SÃO ESPELEÓLOGOS POTIGUARES. ELES VÃO EXPLORAR UMA CAVERNA DESCONHECIDA, E ESTUDAR OS BICHOS QUE VIVEM LÁ.

Fantástico! Mal começou a chover e já está tudo verdinho!

A Caatinga não é mesmo incrível?



Estou vendo! Que lindos! São peixes anuais!

Olha só! Tem peixes aqui nessa poça!

Anuais? Como assim?



Eles nascem, crescem e se reproduzem durante as chuvas, e depois botam ovos que resistem à seca. Quando as chuvas retornam no ano seguinte, tudo começa de novo.

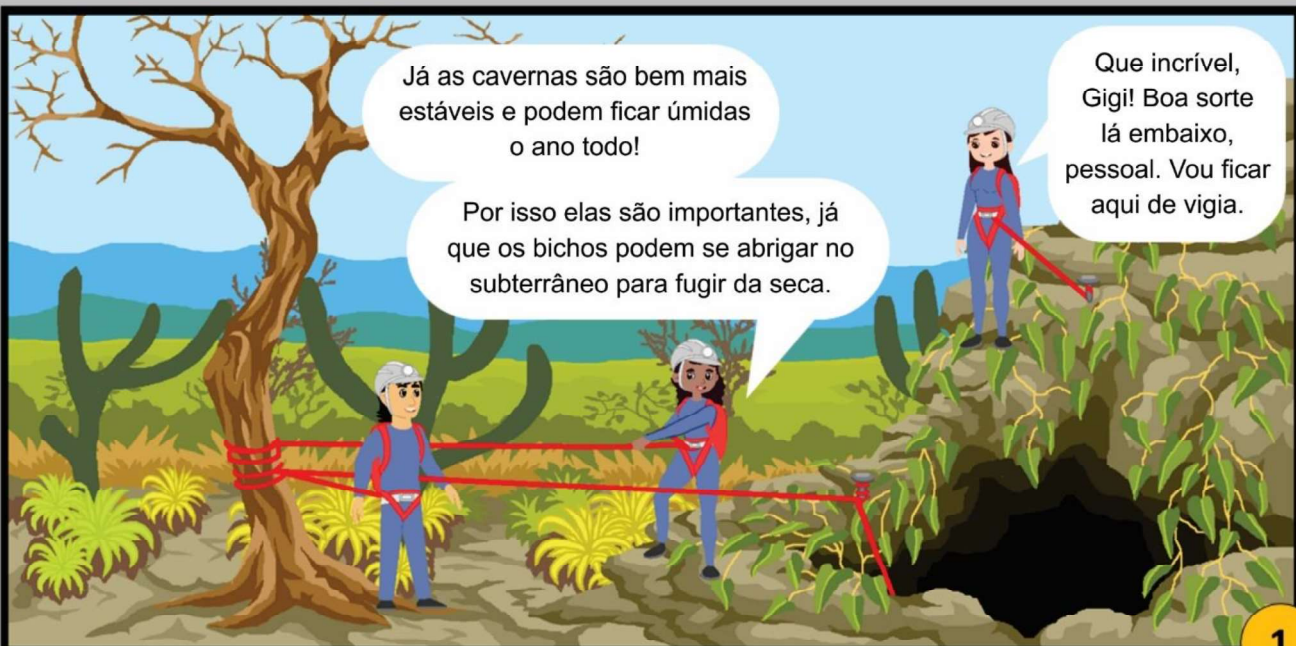


A Caatinga é cheia de plantas e bichos com adaptações como essa para sobreviver à seca. Muitos deles só são encontrados aqui e em nenhum outro lugar. Por isso dizemos que são **endêmicos**.

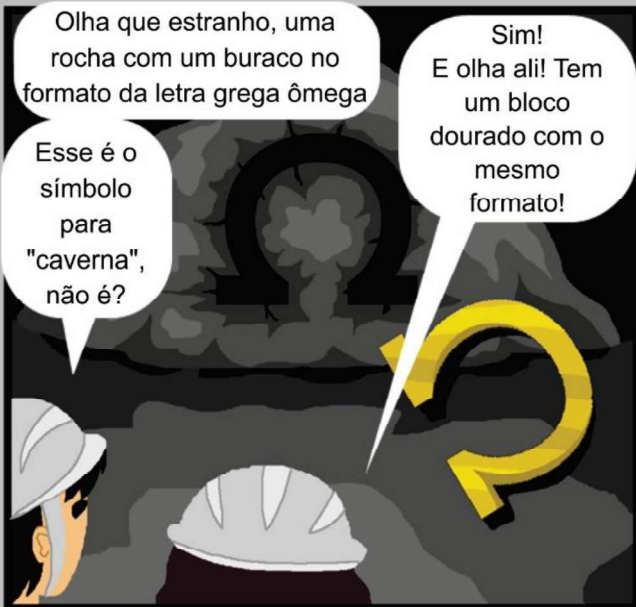
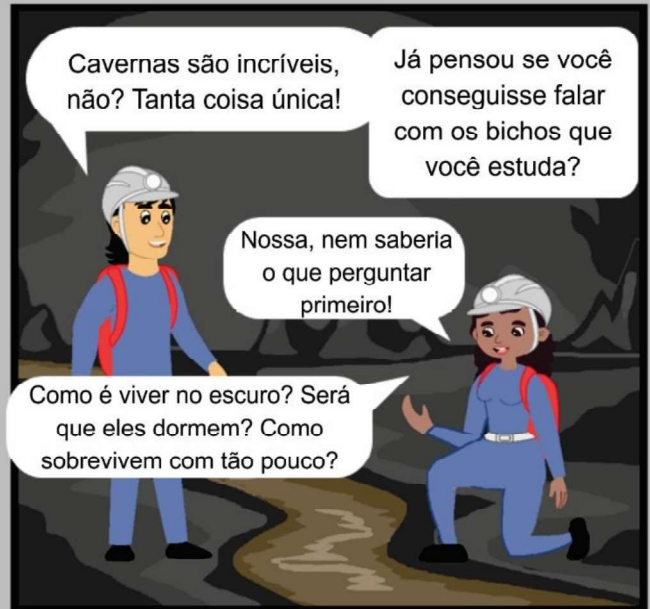
Já as cavernas são bem mais estáveis e podem ficar úmidas o ano todo!

Por isso elas são importantes, já que os bichos podem se abrigar no subterrâneo para fugir da seca.

Que incrível, Gigi! Boa sorte lá embaixo, pessoal. Vou ficar aqui de vigia.



1



O único jeito de voltarmos ao normal é colocando a placa de volta na rocha. Mas como vamos fazer isso desse tamanho?!

Acho que precisamos ir lá em cima tentar chamar a atenção de Lelê. Ela poderia nos ajudar com isso!

Boa ideia! Mas antes vamos no rio. Tô morrendo de sede, e todo nosso equipamento e suprimento continuam grandes!

Nossa, de perto dá pra ver que o rio tá meio barrento...

Tá mesmo... Mas é essa água ou nenhuma...

AAAAAHHH!!!

Ah... Pensei que fosse comida...

Por favor! Não me coma!!!

Meu Deus, um *cirolanídeo*\*!

\* Cirolanidae é uma família de crustáceos isópodes aquáticos

Ciro? Não, *Ciro* é o nome do meu primo! Meu nome é Lana!

O que vocês estão fazendo aqui?

3



Eita! Outro cirolanídeo, e de outra espécie! E dois **anfípodas**\*! Acho que vou desmaiar!

\* Amphipoda é uma ordem de crustáceos predominantemente aquáticos

O que está acontecendo aqui?

Prazer, meu nome é Poti. Vocês são comida?

Eu heim, nada fica em segredo aqui por muito tempo...

Oi, eu sou Dinho!

Sou Zé Borges!



Nossa, Poti, você é tão lindo! Sem olhos, branquinho. Mas vocês parecem tão famintos também...

Nós estamos acostumados a encontrar pouca comida nas cavernas, mas ultimamente tem sido mais difícil. A água também está estranha, barrenta e suja. E era para o rio estar bem mais cheio também...



Ufa! Ainda bem que achei essas raízes. Não aguentava mais andar!

Caramba! Uma cigarra troglóbia!

Kinna, é você aí em cima?

Ei, acho que tem mais alguém lá em cima...



\* Schizomida é uma ordem de aracnídeos

Essa não! É um **Schizomida**\*!

Voa! Voa!

Oba, dei sorte hoje...

Vish, deu ruim! É Landim! Ele vai pegar Kinna!



Porcaria...

Voa! Voa!

Não dá! Eu não sei voar! Aaaa!

Eu também não sei, mas não fico subindo em lugar alto...

4



Obrigada por me ajudarem. As raízes da minha caverna secaram e vim procurar comida aqui...

Você me chamou de troglóbia? O que é isso?

Troglóbios são animais que só podem viver no ambiente subterrâneo, Kinna. Se você pudesse viver aqui dentro e lá fora, você seria um **troglófilo**.



Então eu sou um troglófilo! Gosto de passar o tempo aqui, mas está difícil achar comida, então tenho que buscar lá fora...

Caramba! Ainda não me acostumei a estar encolhido!

Oi Deco! Tava sumido!

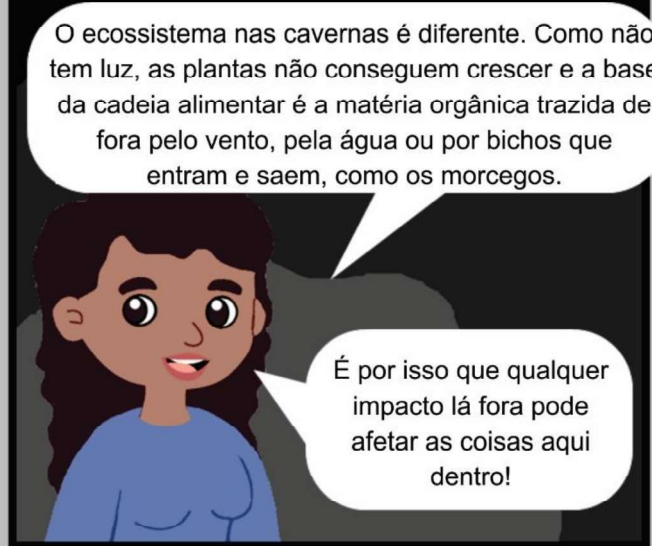
E temos ainda os **troglóxenos**, que precisam sair de vez em quando para achar comida. Como os morcegos.



Alguém me chamou? Tô exausta! Tive que voar bem mais longe para conseguir comida...

Oi, Carol !!!

Que coisa! Todos estão reclamando da falta de comida. O que será que está acontecendo?



O ecossistema nas cavernas é diferente. Como não tem luz, as plantas não conseguem crescer e a base da cadeia alimentar é a matéria orgânica trazida de fora pelo vento, pela água ou por bichos que entram e saem, como os morcegos.

É por isso que qualquer impacto lá fora pode afetar as coisas aqui dentro!



Pois é, gente! Por isso aproveitem bem a refeição, pois foi difícil de conseguir!

Oba! Aqui! Aqui!

ECA! Não! Aqui não!!!

Corre! Corre!



Que delícia de fruta diferente! Epa, chegou mais alguém!

É o meu primo, Ciro!

Opa, cheguei bem na hora! Vai sobrar algo pra mim? Tô exausto!

Não sei como vocês têm coragem de sair por aí desse jeito. Eu não saio daqui por nada!

Você também é de outra caverna, Ciro?

Sim, fica muito longe daqui, mas às vezes eu venho visitar meus parentes. Nesta época do ano costuma ter mais água e facilita a viagem, mas este ano tá bem difícil...

Engraçado, vocês três são da mesma família, mas são tão diferentes...

Mesma família!?

Como assim?! Eles que são primos, não eu!

Sim, Dinho é só nosso amigo.

Sim, eu entendi. É que vocês fazem parte de uma grande família de crustáceos chamada Cirolanidae. É um grupo quase só de bichos marinhos, mas aqueles que ocorrem em água doce podem ser achados em cavernas próximas ao mar.

Que viagem!

Acho que ninguém aqui sabia disso!

Caramba!

Já vocês dois aí atrás são anfípodos, provavelmente de origem marinha também...

Essa conversa me lembrou que estamos aqui justamente para estudar animais como vocês, para aprendermos mais sobre suas origens...

Opa, agora eu também me interessei! Sempre quis saber mais sobre minha história!

Ei! Só não venha tentar me comer de novo!!!

Não foi pessoal, eu só estava com fome.

Acho que seria legal se todos nós participássemos então...

Quem sabe não descobrimos o que está acontecendo com a comida e a água também?

Que ótimo, pessoal! Muito obrigada! Só vou precisar de umas amostras de DNA de vocês.

Ainda bem que o material de coleta estava no meu bolso e encolheu conosco...

Nós voltaremos para contar tudo a vocês, mas primeiro precisamos voltar ao tamanho normal...

Acho que Carol e os amigos dela podem ajudar vocês...

Com uma pequena amostra de cada um de vocês, poderemos entender melhor as suas origens. E vamos tentar descobrir o que está acontecendo na caverna também.

6



Muito obrigada por tudo, pessoal! Nós voltaremos com as novidades!

Isso pessoal, continuem assim! Calma e devagar!

Só não toquem na pedra, senão vocês serão morcegos gigantes!

Tentem ajudar a gente!

Até logooo!

Eita, que pesado!

Ufff... Vocês estão muito exigentes pra quem não está fazendo nada!



Uhuuu! Deu certo!!!

Aaai, tô com câimbra!

Ainda bem, a gente não conseguiria fazer de novo!

**TZAAACTH!**



Não se preocupem! Voltaremos em breve!

Vamos descobrir o que está acontecendo lá fora que está afetando a caverna!



Nossa, que demora! Já estava pensando em descer para resgatar vocês!

Lelê, você não vai acreditar no que aconteceu!

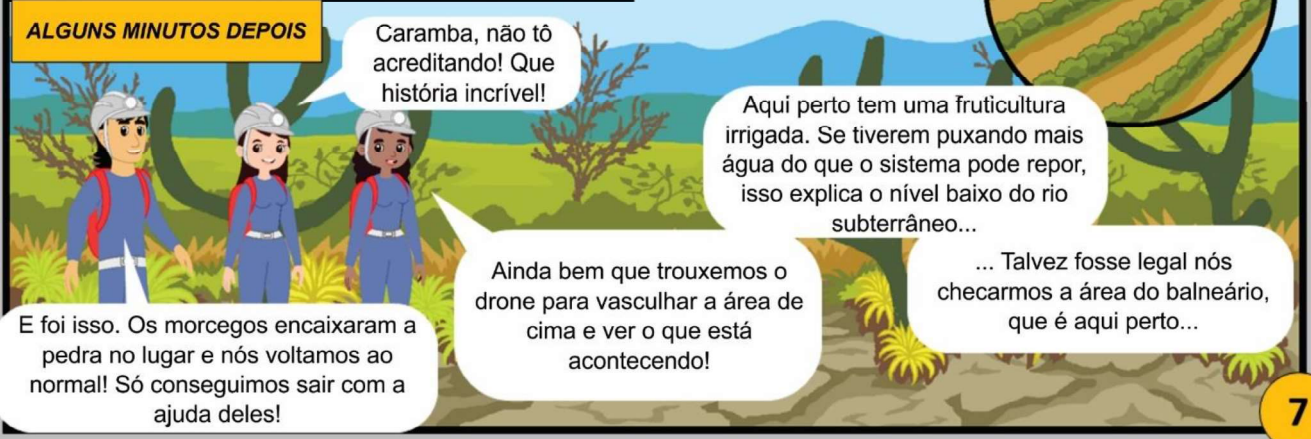
Senta aí que temos muito pra te contar!



Vejo também algumas dolinas e áreas desmatadas

Tem um balneário indo na direção da correnteza do rio subterrâneo. Deve ser a ressurgência da caverna.

Isso explica a água barrenta e porque os morcegos não acham mais comida...



**ALGUNS MINUTOS DEPOIS**

Caramba, não tô acreditando! Que história incrível!

Aqui perto tem uma fruticultura irrigada. Se tiverem puxando mais água do que o sistema pode repor, isso explica o nível baixo do rio subterrâneo...

Ainda bem que trouxemos o drone para vasculhar a área de cima e ver o que está acontecendo!

... Talvez fosse legal nós checarmos a área do balneário, que é aqui perto...

E foi isso. Os morcegos encaixaram a pedra no lugar e nós voltamos ao normal! Só conseguimos sair com a ajuda deles!

**NO BALNEÁRIO**

Nossa, era para o balneário estar cheio nesta época do ano, mas o movimento está bem fraco!

Deve ser por que tem menos água, e além de tudo ela está suja e barrenta. Precisamos fazer alguma coisa!

**LOGO NO DIA SEGUINTE, GIGI CONTINUOU COM SUA PESQUISA NO LABORATÓRIO. ENQUANTO ISSO, LELÊ E PENINHA ENTRARAM EM CONTATO COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS E A PREFEITURA PARA CONSEGUIR MAIS INFORMAÇÕES SOBRE OS PROBLEMAS NA ÁREA DA CAVERNA...**

A extração de DNA ficou ótima!

Maravilha, muito obrigada pela ajuda!

Era tudo o que eu precisava saber, valeu!

**O DESMATAMENTO PRÓXIMO À CAVERNA ERA ILEGAL, E POR ISSO FOI PARALISADO E O RESPONSÁVEL TEVE QUE REFLORESTAR A ÁREA.**

**ALGUMAS FRUTICULTURAS TIVERAM QUE PERFURAR POÇOS PROFUNDOS PARA NÃO USAR ÁGUA DO AQUIFERO CÁRSTICO\*. ASSIM, FOI POSSÍVEL CONCILIAR AS PLANTAÇÕES COM O USO SUSTENTÁVEL DA ÁGUA SUBTERRÂNEA.**

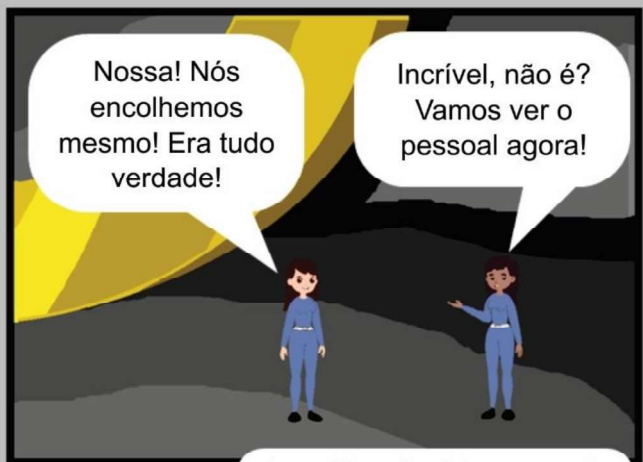
\* Aquíferos cársticos são aqueles nos quais a água circula pelas aberturas ou cavidades nas rochas, principalmente calcários. Onde ocorre o calcário Jandaíra, o aquífero é raso, de recarga irregular e suscetível a contaminação.

Com o poço profundo, eu tenho água boa o ano inteiro! A plantação melhorou muito!

E OS TRÊS AMIGOS CONTINUARAM DESCOBRINDO NOVAS CAVERNAS, INCLUINDO UMA MUITO BONITA E PRÓXIMA DAQUELA ONDE A AVENTURA COMEÇOU.



E QUANDO TERMINARAM OS ESTUDOS, VOLTARAM JUSTAMENTE PARA A CAVERNA ONDE TUDO COMEÇOU.

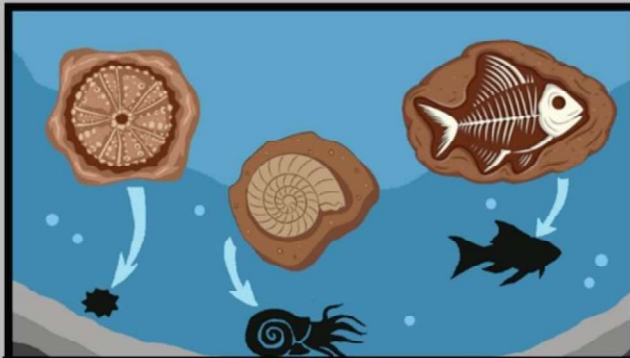


E o que você descobriu sobre a nossa história?

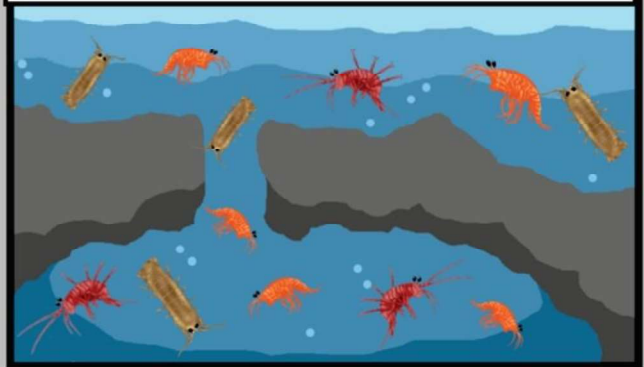
Nossa, descobri tanta coisa! Mas a história é longa, e começa quando o sertão ainda era mar...



Depois, o mar recuou e cavernas foram formadas. Então o mar avançou novamente, e os ancestrais de vocês, cirrolanídeos e anfípodes que viviam na região, provavelmente entravam e saíam das cavernas quando quisessem

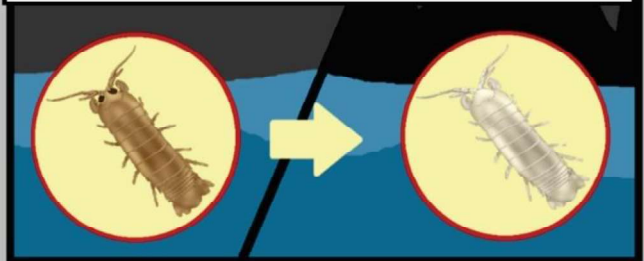
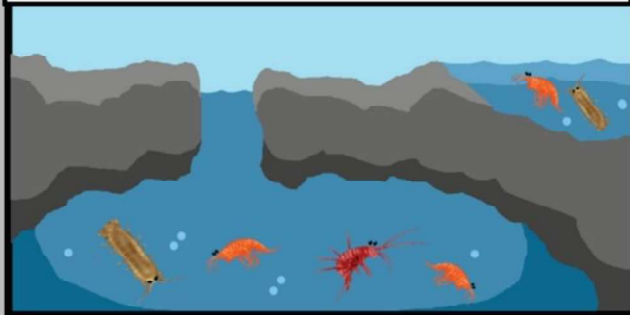


Nos calcários da nossa região, encontramos fósseis de animais marinhos que viveram na época dos dinossauros! Isso indica que naquela época tudo aqui era coberto por um mar raso...



Mas foi então que o mar recuou tanto, que parte dos seus ancestrais acabou ficando presa no subterrâneo, sem poder voltar para o oceano de novo.

Ao longo de muito tempo, a evolução foi levando a uma adaptação cada vez maior à água doce, à falta de luz e às outras condições típicas do ambiente subterrâneo. Nesse processo, que durou muuuitas gerações, as novas espécies foram ficando cada vez mais parecidas com vocês agora: branquinhos, sem olhos e muito adaptados a viver aqui!



É por isso que, além de troglóbios, vocês também são chamados de **relictos oceânicos**.

Ei! E quanto à minha história?

Uau!!! Que legal!

Caramba! Nossos antepassados vieram do mar!

Hum, o que é o mar?

Os fósseis também ajudam a entender a sua história, Kinna!

O clima nem sempre foi tão seco nessa região. Havia florestas e animais muito grandes lá fora. Seus antepassados viviam aqui também: os adultos na vegetação, e os filhotes (ninfas) se alimentando das raízes embaixo da terra.



Mas, com o tempo, o clima foi mudando e ficando cada vez mais seco. Deve ter ficado muito difícil para os adultos viverem na superfície...

E como parte do ciclo de vida já era subterrâneo, não foi tão difícil passar a viver o tempo todo nas cavernas, onde é sempre mais úmido e estável.



Assim, seus ancestrais foram ficando gradualmente mais parecidos com você, Kinna: sem olhos, clarinha e sem conseguir voar...



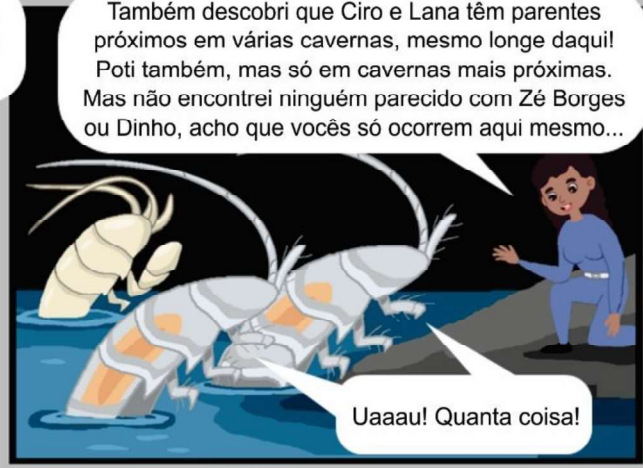
Nossa, então eu também sou uma sobrevivente de todas essas mudanças?

Sim, você é o que chamamos de **relicto geográfico**, já que sobreviveram apenas em poucas áreas em relação ao que era no passado.

Por isso que todos vocês são tão importantes! Alguns, como Dinho e Zé Borges, só ocorrem em uma ou poucas cavernas bem próximas. Isso é o que chamamos de endemismo extremo.

Caramba!

Encontrei parentes de Kinna em várias cavernas, mas acho que são parentes distantes, talvez vocês nem se reconheçam mais. Enquanto uns são endêmicos, outros viajam e têm parentes em outros lugares... Isso nos ensina muito sobre a dinâmica da vida nas cavernas e os processos evolutivos que ocorreram!



Também descobri que Ciro e Lana têm parentes próximos em várias cavernas, mesmo longe daqui! Poti também, mas só em cavernas mais próximas. Mas não encontrei ninguém parecido com Zé Borges ou Dinho, acho que vocês só ocorrem aqui mesmo...

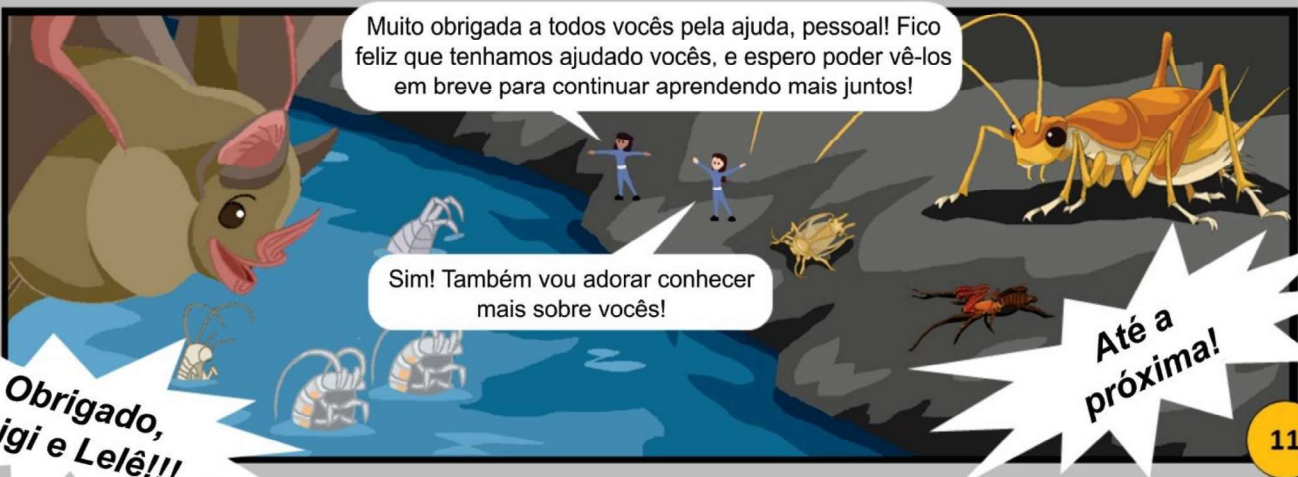
Uaaau! Quanta coisa!



Lamento, pessoal. Vou ficar devendo por enquanto...

E sobre a gente? O que você descobriu?

... Preciso pesquisar mais, e é por isso que nossa história não acaba aqui!



Muito obrigada a todos vocês pela ajuda, pessoal! Fico feliz que tenhamos ajudado vocês, e espero poder vê-los em breve para continuar aprendendo mais juntos!

Sim! Também vou adorar conhecer mais sobre vocês!

Obrigado, Gigi e Lelê!!!

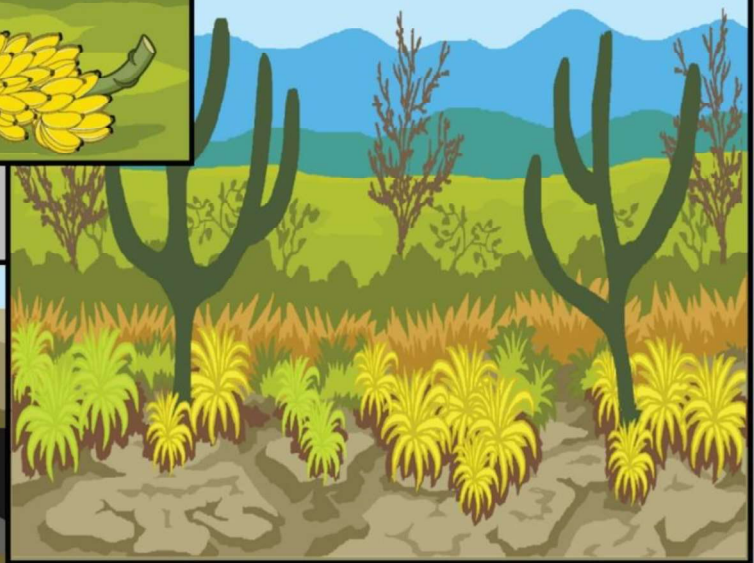
Até a próxima!

AS FRUTICULTURAS CONTINUARAM PRODUZINDO,  
E CUIDANDO DA ÁGUA SUBTERRÂNEA AO MESMO  
TEMPO...



**E TUDO FICOU BEM  
NO FINAL!**

A CAATINGA DESMATADA SE RECUPEROU...



... A CAVERNA COM VÁRIOS ESPELEOTEMAS PASSOU  
A RECEBER TURISTAS...



... SEM PREJUDICAR OS SERES QUE  
VIVIAM NA OUTRA CAVERNA...

... E O BALNEÁRIO VOLTOU A SER UM MOVIMENTADO  
PONTO TURÍSTICO DE TODA A REGIÃO.



Hum... Quem sabe  
na próxima  
aventura?

Ei, Gigi, só faltou  
um peixe troglóbio...

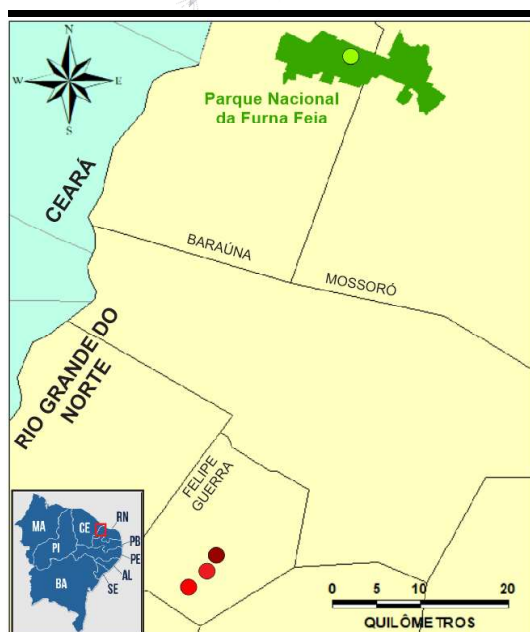
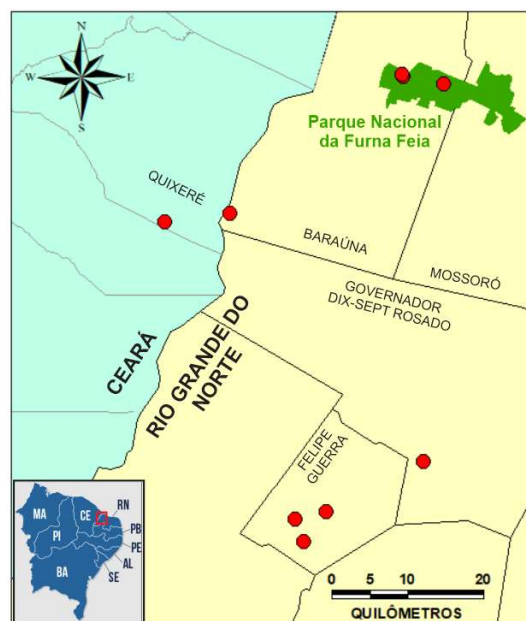
Sim, mas antes  
vamos relaxar.  
Nós merecemos..  
Ahhhh...

**FIM**

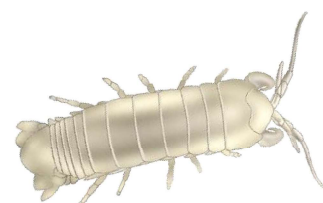
E OS NOSSOS AMIGOS ESPELEÓLOGOS?  
ESTÃO APROVEITANDO A VIDA, QUE NINGUÉM É DE FERRO.  
MAS JÁ ESTÃO PENSANDO NAS PRÓXIMAS AVENTURAS,  
E NO QUE MAIS VÃO DESCOBRIR...

## PERSONAGENS

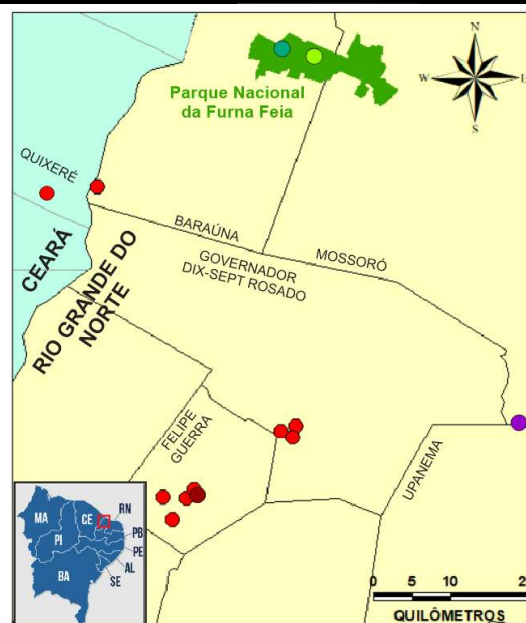
**Lana e Ciro** são isópodes (Isopoda) aquáticos da família Cirolanidae (uma família com espécies predominantemente marinhas, mas com alguns troglóbios encontrados em cavernas de regiões próximas ao mar). É a nossa espécie troglóbia com maior distribuição (círculos vermelhos no mapa ao lado), sendo encontrada em cavernas que chegam ao nível do lençol freático em Felipe Guerra, Governador Dix-Sept Rosado e Baraúna (incluindo cavernas no Parque Nacional da Fuma Feia), no Rio Grande do Norte, e Quixeré, no Ceará.

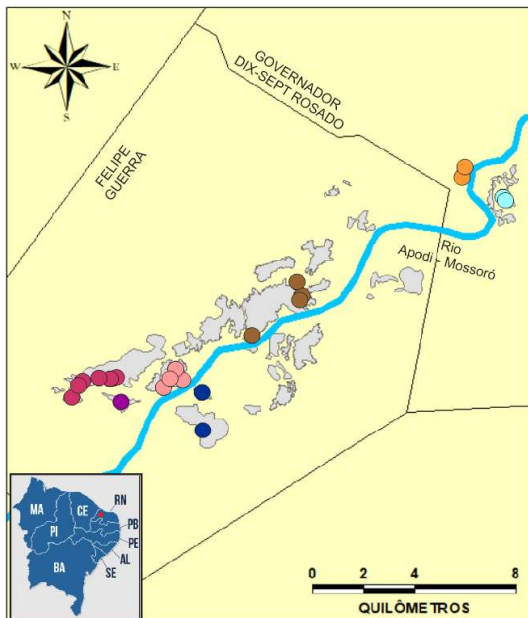


**Dinho** também é um isópode troglóbio aquático da família Cirolanidae. Ele representa um grupo com pelo menos três linhagens isoladas e geneticamente diferentes (que podem até mesmo ser diferentes espécies), duas encontradas em cavernas e nascentes de Felipe Guerra e uma terceira (a mais diferente) em uma caverna no Parque Nacional da Fuma Feia (representadas por círculos de cores diferentes no mapa ao lado). Eles são normalmente encontrados em lagos ou córregos subterrâneos, caminhando sobre o fundo repleto de matéria orgânica (como guano) ou associados a raízes submersas. Nenhuma das prováveis novas espécies está oficialmente descrita.

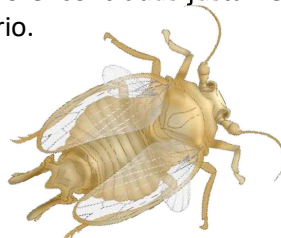


**Poti** é um anfípode (Amphipoda) da família Mesogammaridae. Assim como Dinho, Lana e Ciro, é um troglóbio considerado relicto oceânico. Ele representa um grupo com pelo menos cinco linhagens geneticamente diferentes (que podem ser diferentes espécies), distribuídas de acordo com as drenagens (rios e córregos) da região. Eles são normalmente encontrados em lagos, córregos e rios subterrâneos, caminhando sobre o fundo repleto de matéria orgânica (como guano) ou associados a raízes submersas. A linhagem encontrada nas cavernas representadas pelos círculos vermelhos é a única espécie descrita, *Potiberaba porakuara*, as demais podem ser novas espécies (incluindo a representada por um círculo vermelho escuro no município de Felipe Guerra).

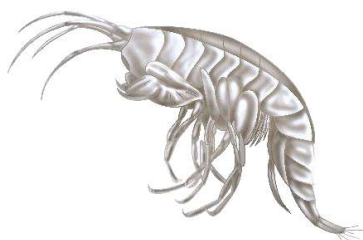
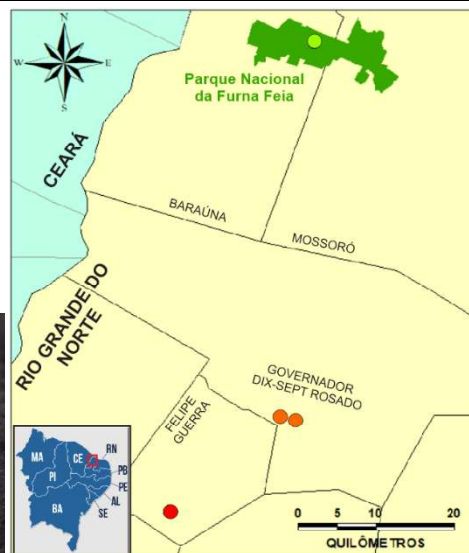




**Kinna** é uma cigarrinha troglóbia da família Kinnaridae. Ela representa a espécie *Kinnapotiguara troglobia*, que ocorre em várias cavernas nos municípios de Felipe Guerra e Governador Dix-Sept Rosado, inclusive em cavernas em margens opostas do rio Apodi-Mossoró. Elas são encontradas caminhando no piso, sob rochas ou em paredes de cavernas, quase sempre associada a raízes das quais sugam a seiva. Atualmente sabemos que existem pelo menos sete linhagens geneticamente distintas (o que faz de *K. troglobia* um provável complexo de espécies), distribuídas de acordo com os lajedos (aflorentamentos calcários) da região. As maiores diferenças genéticas são encontradas justamente entre linhagens de margens opostas do rio.

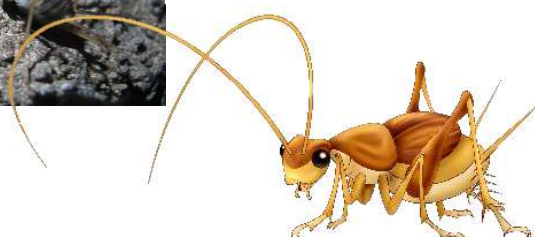
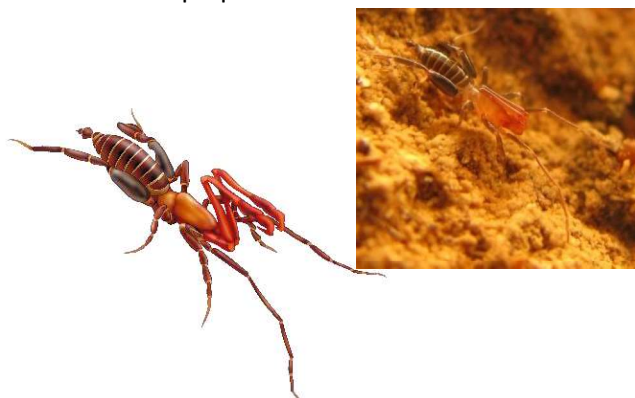


**Zé Borges** é um anfípode troglóbio como Poti, também é considerado um relictivo oceânico, no entanto pertence a outra família (Seborgiidae). Ele representa prováveis três espécies do gênero *Seborgia*, das quais apenas uma está descrita (*S. potiguar*, de cavernas em Governador Dix-Sept Rosado). Duas prováveis novas espécies (com base em análises morfológicas preliminares) foram recentemente descobertas em cavernas de Felipe Guerra e Baraúna (no Parque Nacional da Fuma Feia).



**Landim** representa a espécie *Rowlandius potiguar*, um Schizomida (ordem de aracnídeos) da família Hubbardiidae. É considerada uma espécie troglófila (que consegue viver tanto dentro como fora de cavernas), e é facilmente encontrada em diversas cavernas na região oeste do Rio Grande do Norte e Leste do Ceará. É um predador, que se alimenta de vários outros pequenos invertebrados.

**Deco** representa a espécie *Endecous potiguar*, um grilo facilmente encontrado em diversas cavernas na região oeste do Rio Grande do Norte e Leste do Ceará. Assim como Landim, é considerada uma espécie troglófila. Alimenta-se de uma grande variedade de coisas, desde folhas e outros materiais vegetais até fungos e guano de morcegos.



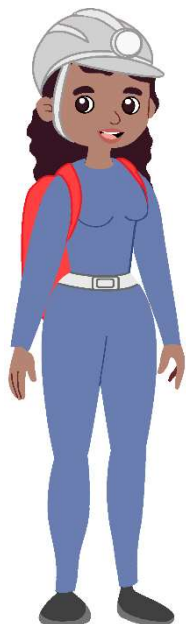
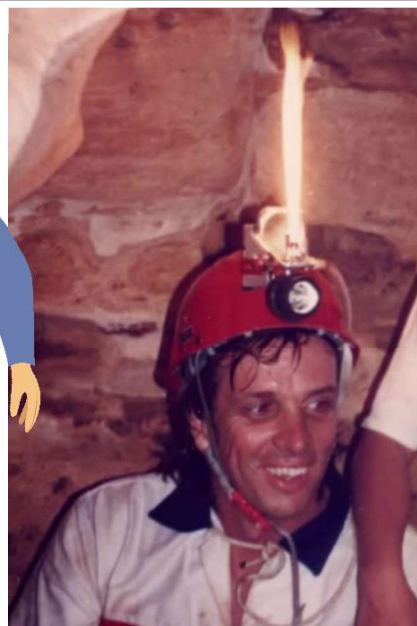
**Carol** representa *Carollia perspicillata*, espécie de morcego frugívoro amplamente distribuída desde o Sul do Brasil até o México. Os morcegos são considerados troglóxenos (usam cavernas como abrigos, mas precisam sair para se alimentar, por exemplo), e têm função ecológica muito importante no ambiente cavernícola. Suas fezes (guano) servem de alimento para várias espécies que vivem nas cavernas.



**Peixe anual.** Os peixes anuais (também chamados de peixes sazonais ou peixes das nuvens) representam muito bem as espécies com adaptações necessárias a viver na Caatinga. Eles crescem e se reproduzem em poças e outros alagados sazonais durante a estação chuvosa, botando ovos que resistem à seca. Quando chove, os ovos eclodem dando origem a outra geração que reinicia o ciclo. A espécie representada, *Hypsolebias antenori*, é encontrada apenas no oeste do Rio Grande do Norte e no Nordeste do Ceará.



**Peninha** é nossa homenagem ao geólogo e espeleólogo Geraldo Luiz Nunes Gusso (1953-1993), que também era conhecido como Peninha. Ele foi um dos mais importantes espeleólogos brasileiros, deixando um dos seus principais legados no Rio Grande do Norte. Teve papel determinante na conservação do Lajedo de Soledade, em Apodi/RN, um importante sítio arqueológico e paleontológico. Foi um dos pioneiros da Espeleologia potiguar e um dos fundadores do primeiro grupo de Espeleologia no RN, o Clube de Espeleologia do Rio Grande do Norte (CERN). Ele participou das primeiras expedições espeleológicas no final da década de 80, quando algumas das mais importantes cavernas potiguares foram oficialmente descobertas.



**Gigi e Lelê** também são inspiradas em pessoas de verdade, Giovanna e Letícia. Elas são irmãs, muito inteligentes e adoram estudar, aprender coisas novas e participar de aventuras.

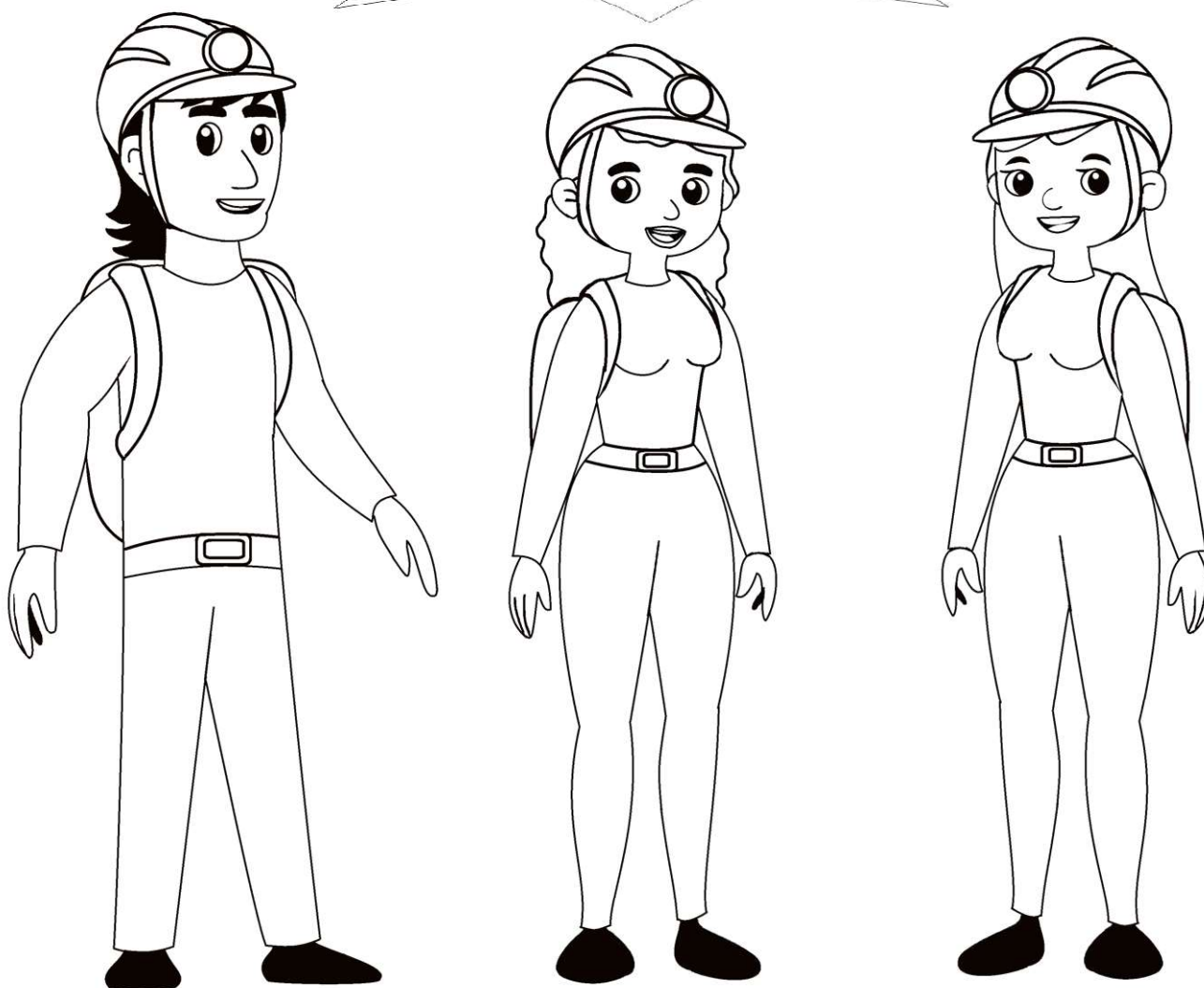
Esperamos que você tenha gostado de aprender sobre as nossas cavernas, e também sobre os animais especiais e únicos que vivem nelas!

Que tal aproveitar os joguinhos e desafios das próximas páginas? Com eles você vai verificar o que aprendeu, e também reforçar os novos conhecimentos.

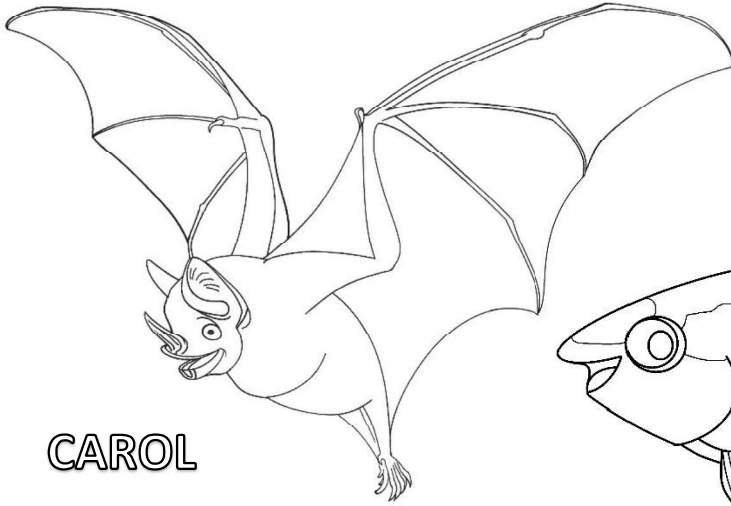


Que tal colorir a gente e os nossos amiguinhos?

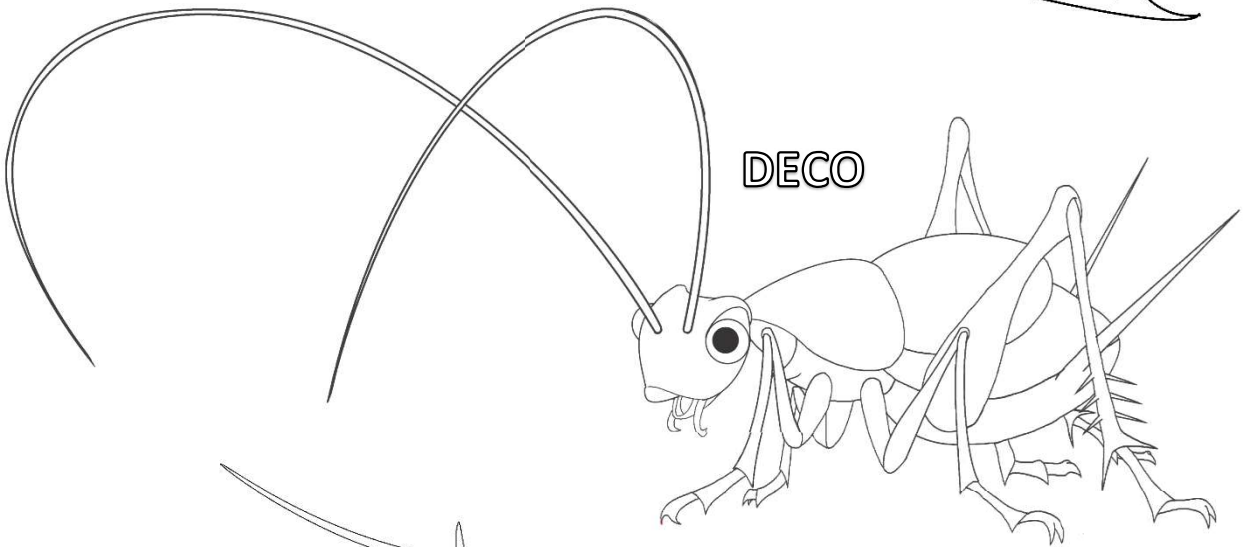
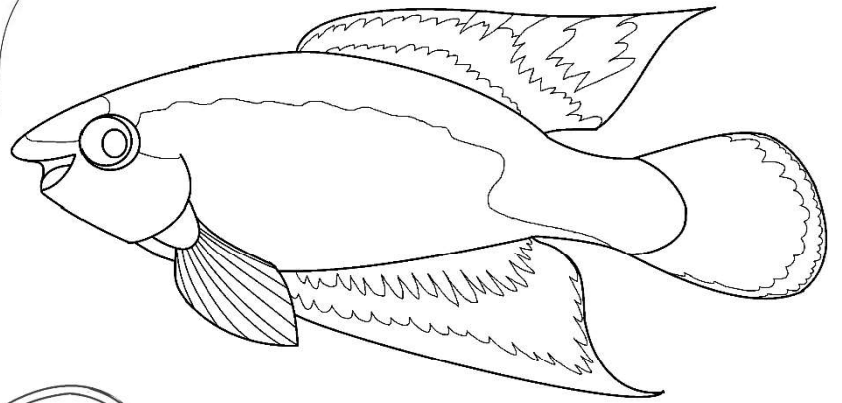
Mas use sua imaginação, não precisa  
ficar igual à história!



PEIXE ANUAL

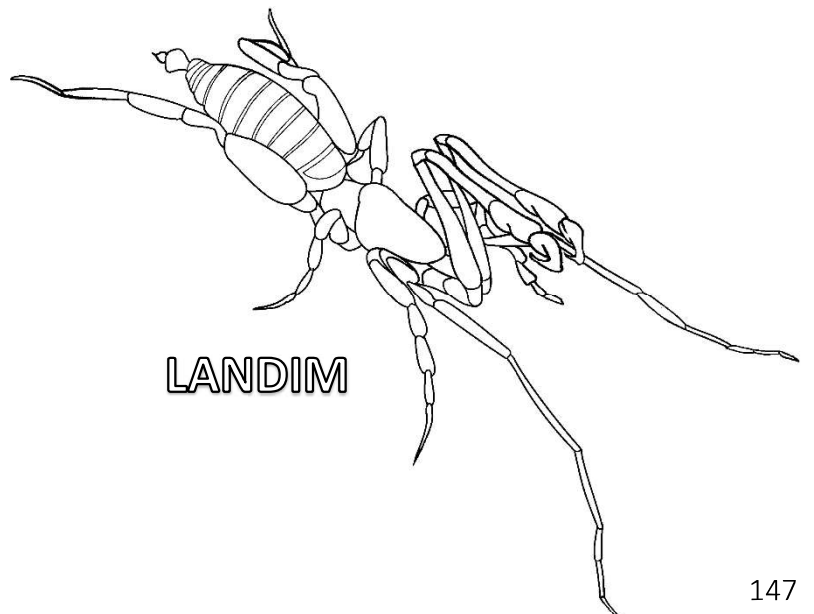
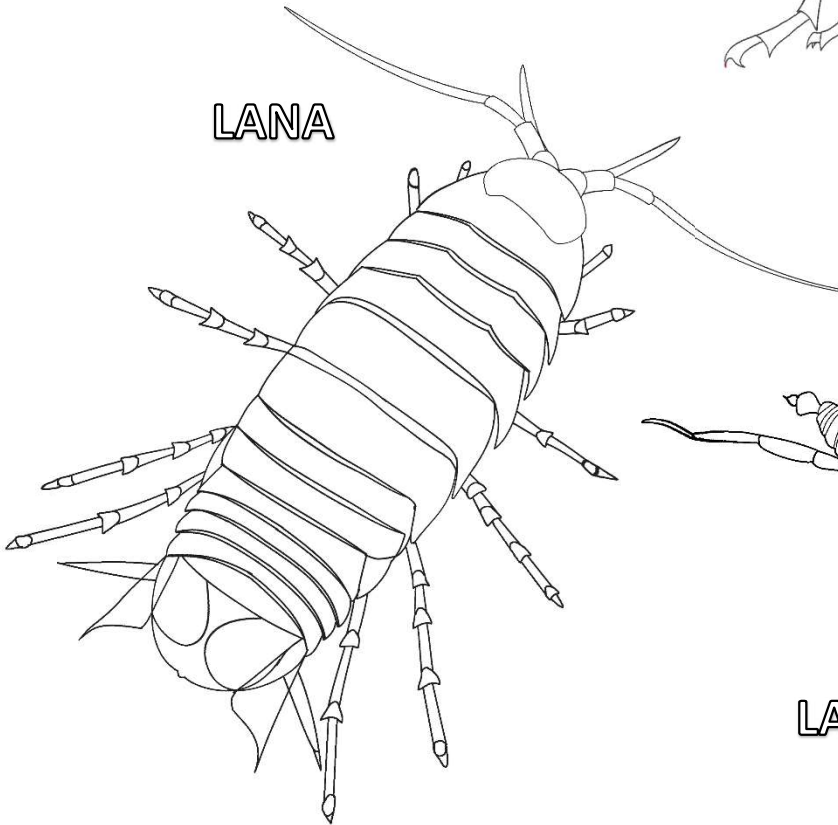


CAROL



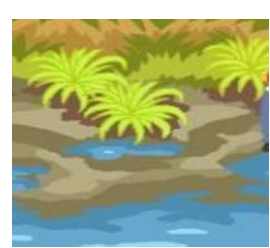
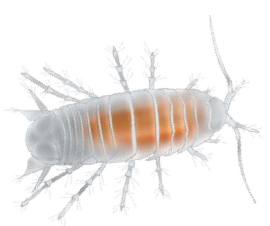
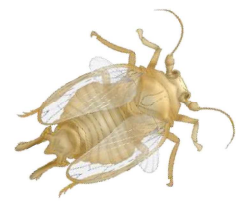
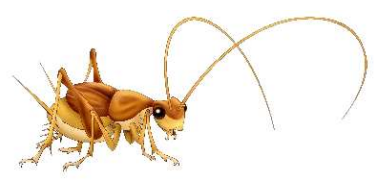
DECO

LANA

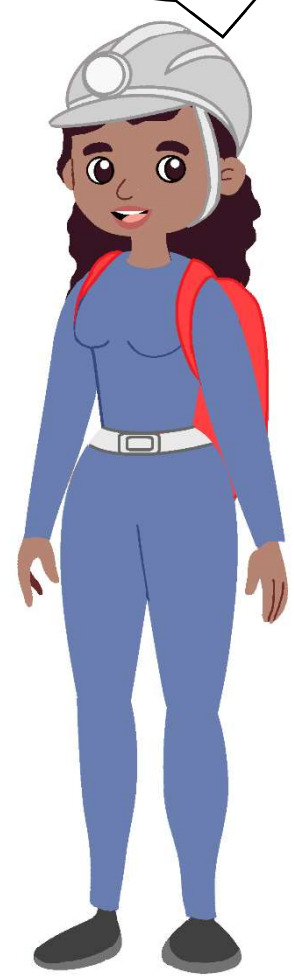


LANDIM

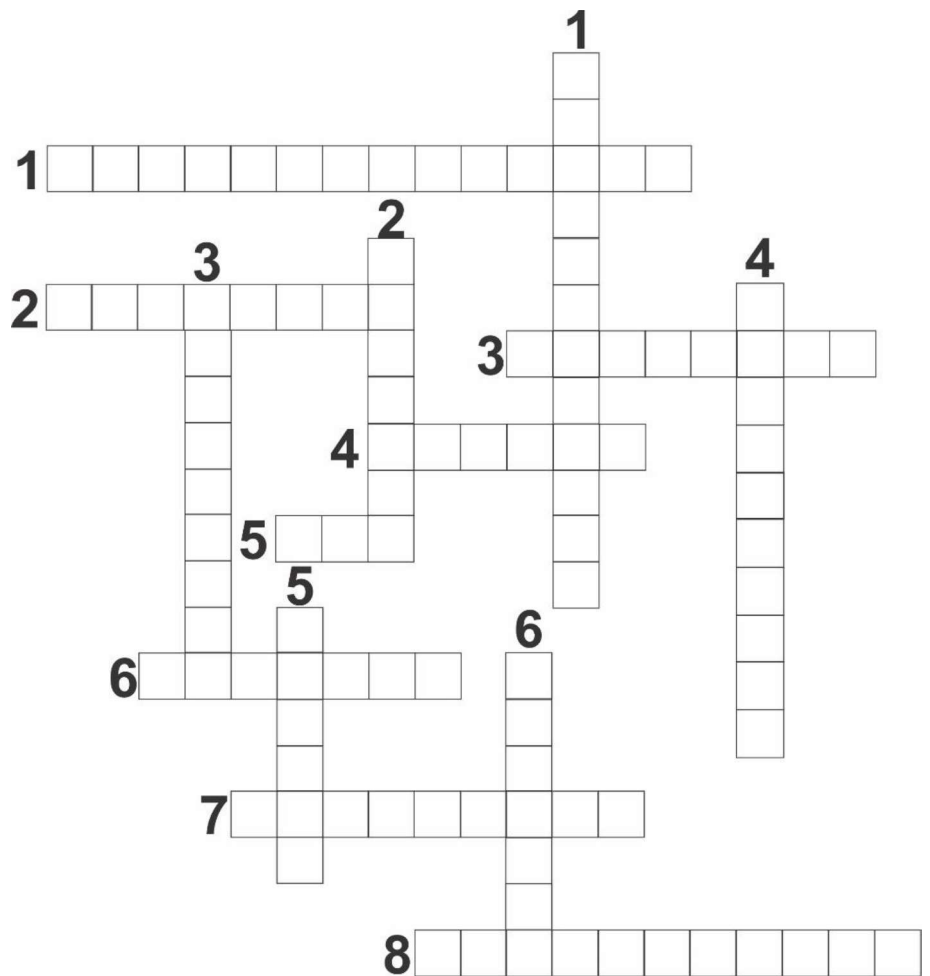
Vamos ajudar Kinna a chegar até as raízes? Mas tomem cuidado com Landim!



Você sabe qual o habitat de cada bicho? Ligue cada um dos nossos amigos ao lugar onde ele vive.



Veja as dicas abaixo  
para preencher as palavras  
cruzadas!



### HORIZONTAIS

1. Como se chama o turismo em cavernas?
2. Principal bioma do Nordeste do Brasil.
3. Tipo de rocha onde normalmente se formam as cavernas.
4. Kinna se alimenta da seiva delas.
5. Molécula que carrega a informação genética.
6. Animal que usa as cavernas como abrigo durante o dia, e sai durante a noite para se alimentar.
7. Quando uma espécie só existe em uma determinada região.
8. Quando o desenvolvimento atual não compromete a capacidade dos recursos naturais de atender as necessidades das futuras gerações.

### VERTICAIS

1. Remoção da vegetação nativa de determinado lugar.
2. Onde se passa a maior parte da aventura de Gigi, Lelê e Peninha?
3. Animal exclusivamente subterrâneo.
4. Animal que pode viver tanto dentro como fora de cavernas.
5. Os ancestrais de Lana, Ciro, Poti e Zé Borges viviam no...
6. Vestígios de plantas e animais (como ossos, conchas, etc.) que viveram no passado, preservados geralmente em rocha.

Procure as palavras em negrito no caça-palavras abaixo!



Que maravilha! Olha o quanto aprendemos com Gigi, Lelê e Peninha! Aprendemos que a **Caatinga**, o único bioma exclusivamente brasileiro, apresenta fauna e flora sensacionais! Os animais e plantas da Caatinga precisam de **adaptações** para conviver com os períodos secos. Aprendemos que as **cavernas** são ambientes mais estáveis, que muitas vezes funcionam como refúgios e abrigam espécies que não existem na superfície, os **troglóbios**! Nas nossas cavernas existem várias espécies de troglóbios que são **endêmicas**, só tem aqui e em nenhum outro lugar no mundo. Aprendemos que algumas são até mesmo **relictos** oceânicos, como os isópodes **cirolanídeos** e alguns **anfípodes**. Isso mesmo! Esses bichinhos são provas de que o **sertão** já foi mar! E a cigarrinha **Kinnapotiguara**? Também só tem aqui, e se alimenta da seiva das raízes que chegam até as cavernas... Quanta coisa interessante! Mas precisamos estudar mais para valorizar nosso patrimônio, e aprender a viver sem prejudicar nossa **biodiversidade** subterrânea. O que nós fazemos aqui fora pode prejudicar o ambiente das cavernas, já que tá tudo interligado. Se os **morcegos** não conseguem se alimentar aqui fora, porque a floresta foi desmatada, por exemplo, eles podem deixar de produzir o **guano** que ajuda a alimentar parte dos bichos que vivem nas cavernas. Mas dá pra fazer tudo o que a gente quer, basta ter cuidado e estudar como fazer direito. Dá até pra visitar as cavernas mais bonitas, fazer **espeleoturismo**, porque a gente só valoriza o que a gente conhece. E tem muito pra conhecer ainda, estudar para saber como usar os recursos naturais hoje sem acabar com eles. Afinal, quem não quer que seus filhos e netos conheçam essas belezuras também? Isso é **desenvolvimento sustentável**!

V R C T O D O S C E N D Ê M I C A S C I E N C I A  
 C T M O R C E G O S D I G V T R N C V M S C T E B  
 K I C M B I O J A L E L E T B T F X C B P W Q E T  
 I B F R T T Y C M E N G O F L A Í C G S E R T ã O  
 N A G C G A D A P T A Ç Õ E S V P R B I L O G I N  
 N M P R T Y U A C R T N V Y R C O T G L E C V T V  
 A A N C E D O T S E V T Y U T R D V I E O E S G R  
 P F F B I O D I V E R S I D A D E R G L T R T U T  
 O S F I R S R N T Y U V B Y U D S T I G U A N O O  
 T A C O T R O G L Ó B I O S B D T I F L R S C E D  
 I B C I R O L A N Í D E O S V C B R E L I C T O S  
 G S R N F T U N M R T Y U C A V E R N A S R O P T  
 U W T E R T T I O V B T E C E C A V C V M R T O R  
 A W R D E S E N V O L V I M E N T O C V O S O L B  
 R A E B I O P E S U S T E N T Á V E L M A R T O V  
 A M E R W X D E N T R A D E N R T Y U N V B T V C

GABARITO





V R C T O D O S C E N D Ê M I C A S C I E N C I A  
 C T M O R C E G O S D I G V T R N C V M S C T E B  
 K I C M B I O J A L E L E T B T F X C B P W Q E T  
 I B F R T T Y C M E N G O F L A Í C G S E R T ã O  
 N A G C G A D A P T A Ç Õ E S V P R B I L O G I N  
 N M P R T Y U A C R T N V Y R C O T G L E C V T V  
 A A N C E D O T S E V T Y U T R D V I E O E S G R  
 P F F B I O D I V E R S I D A D E R G L T R T U T  
 O S F I R S R N T Y U V B Y U D S T I G U A N O O  
 T A C O T R O G L Ó B I O S B D T I F L R S C E D  
 I B C I R O L A N Í D E O S V C B R E L I C T O S  
 G S R N F T U N M R T Y U C A V E R N A S R O P T  
 U W T E R T T I O V B T E C E C A V C V M R T O R  
 A W R D E S E N V O L V I M E N T O C V O S O L B  
 R A E B I O P E S U S T E N T Á V E L M A R T O V  
 A M E R W X D E N T R A D E N R T Y U N V B T V C

## DISCUSSÃO

Devido a suas fragilidades intrínsecas, as cavernas e sua biodiversidade associada estão diferencialmente expostas a impactos decorrentes de atividades antrópicas (Mammola et al., 2019). A ocorrência de atividades potencialmente impactantes às cavernas é comum em áreas de grande relevância espeleológica, tais como o oeste do Estado do Rio Grande do Norte, e diversos impactos decorrentes de mineração, desmatamento e turismo desordenado, por exemplo, já foram identificados em cavernas da região (Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2010).

Além de ações voltadas à delimitação e implantação de áreas protegidas, como as unidades de conservação, estratégias de uso sustentável do patrimônio espeleológico devem levar em consideração ações de divulgação e valorização das cavernas. Assim, a educação ambiental surge como uma ferramenta para divulgar o funcionamento do ambiente, como dependemos dele, como nossas atividades podem impactá-lo e como podemos promover seu uso sustentável (Dias, 2004; Ferreira et al., 2008). A valorização das cavernas e sua biodiversidade associada é essencial para incentivar na sociedade o compromisso de conservá-las (Ferreira et al., 2008), sendo de especial importância que essa conscientização chegue às pessoas que vivem em municípios com ocorrência de cavernas (Ferreira et al., 2014).

As cartilhas, então, assumem papel importante nesse processo. Embora a cartilha “Aventura da vida nas cavernas” (Ferreira et al., 2008) aborde especificamente a biodiversidade subterrânea e os possíveis impactos ambientais que a afetam, ela trata a temática de forma ampla e genérica pois foi elaborada com base em um contexto de cavernas em toda a Mata Atlântica. Percebe-se, portanto, que é necessário um esforço na elaboração de materiais baseados em um contexto regional, com espécies e realidade que possam ser reconhecidas pelo público-alvo localmente (Nascimento et al., 2020).

Nesse contexto, a cartilha aqui apresentada surge como um material didático com o objetivo de complementar as informações disponíveis nos livros didáticos de Ciências utilizados nos últimos anos do ensino fundamental (6º ao 9º ano). Ao mesmo tempo em que aborda conceitos gerais sobre a Caatinga e o ambiente subterrâneo, trata da singularidade da fauna subterrânea do oeste do Rio Grande do Norte, como a evolução paleoclimática da região moldou a biodiversidade local e como as atividades humanas podem impactá-la. Traz ainda a mensagem de que é possível conciliar o desenvolvimento com a conservação da natureza, incentivando inclusive a adoção do espeleoturismo, uma prática ainda pouco realizada na região (apesar do enorme potencial), como forma de divulgação das cavernas e geração de renda de forma sustentável para as comunidades locais.

Assim, 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.

Esta estratégia, no entanto, passa pela articulação junto aos gestores de educação locais, bem como a capacitação de professores e, preferencialmente, realização de atividades de campo. Nesse sentido, será fundamental a participação de atores como o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas, vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/CECAV), bem como de universidades que conduzem estudos bioespeleológicos na região, como a UFRN e UFLA, e gestores de áreas protegidas como o Parque Nacional da Fuma Feia (Brasil, 2012).

É desejável, inclusive, que a estratégia seja empregada a médio e longo prazo, visando um melhor resultado quanto à sensibilização ambiental e fixação dos conhecimentos pelo público-alvo (Oliveira et al., 2011). Isso permitiria também uma avaliação de efetividade, e diversos trabalhos têm atestado resultados positivos da utilização de cartilhas como recursos pedagógicos (Pinheiro et al., 2010; Ramos et al., 2012; Diniz et al., 2016; Araújo et al., 2018; Braz et al., 2018). Entendemos, assim, que a cartilha proposta tem potencial para ser adotada e influenciar positivamente na valorização do patrimônio espeleológico pelas comunidades residentes nos municípios com ocorrência de cavernas no oeste do Rio Grande do Norte.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A cartilha “Vida nas caveRNas”, aqui apresentada, é um potencial recurso pedagógico que pode ser utilizado como material didático complementar no ensino formal da disciplina de Ciências, bem como em outras ações de educação ambiental.

A sua adoção, principalmente em uma estratégia continuada de educação ambiental e valorização das cavernas e sua biodiversidade associada, certamente auxiliará na conservação do patrimônio espeleológico excepcional existente na região oeste do Rio Grande do Norte.

Por fim, recomendamos a elaboração de materiais didáticos baseados em contextos regional e até mesmo local. 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.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alt L, Moura V (2014) **Viajando pelas cavernas da Serra do Espinhaço**. Belo Horizonte: Anglo American Brasil, 44p.

Silva KRA, Araújo CC, Araújo WV, França MS, Junior WFP (2020) Elaboração de uma cartilha ilustrada como estratégia de educação ambiental para a preservação do meio ambiente e medidas que devem ser adotadas em caso de acidentes com animais peçonhentos. **Revista Presença** 5(13).

Barbosa GS, Ramos, MA (2020) Conhecimento ecológico local e percepção ambiental de estudantes sobre o bioma caatinga e sua relação com o conhecimento científico. **Experiências em Ensino de Ciências** 15 (1).

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. **Biodiversity and Conservation**. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>.

Brasil. Decreto de 5 de junho de 2012. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional da Furna Feia, nos municípios de Baraúna e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jun. 2012.

Braz PH, Lima B, Cabanha BLC, Marques LA, Volpato MM, Galhardo JA (2018) Educação em saúde para alunos do primeiro ano do ensino fundamental sobre a leishmaniose em seres humanos e animais. **Pubsaúde** 1 (1): 1–7.

CANIE/CECAV (2021) **Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>. Acesso em 31 mai. 2021.

Cardoso P, Borges PAV, Triantis KA, Ferrández MA, Martín HL (2010) Adapting the IUCN Red List criteria for invertebrates. **Biological Conservation** 144: 2432-2440. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.06.020>.

Cardoso P, Erwin TL, Borges PA, New TR (2011) The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. **Biological Conservation** 144(11): 2647-2655.

Cardoso RC, Ferreira, RL, Souza-Silva M (2021) Priorities for cave fauna conservation in the Iuiu karst landscape, northeastern Brazil: a threatened spot of troglobitic species diversity. **Biodiversity and Conservation** 30(5): 1433-1455.

Castro-Souza RA, Zefa E, Ferreira RL (2017) Two new species of cave crickets *Endecous (Notoendecous)* Gorochov, 2014 (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae) from northeastern Brazil. **Zootaxa** 4318(3): 474-498.

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.

D'Amen M, Bombi P, Campanaro A, Zapponi L, Bologna MA, Mason F (2013) Possible directions in the protection of the neglected invertebrate biodiversity. **Animal Conservation** 16(4): 383-385.

Dias GF (2004) **Educação ambiental princípios e práticas**. 9 ed., São Paulo, GAIA, 551pp.

Diniz FM, Cordeiro Junior DA, Sabino CVS (2016) Cartilha ilustrada com alguns animais nativos do cerrado: um material paradidático de ciências, para estudantes de escolas públicas de Esmeraldas – MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde** 14(2): 1242-1254.

Donato CR (2018) **O eco das cavernas: da dissolução à vida**. 1. ed. v.1, Curitiba: Appris.

Donato CR, Dantas MAT (2009) CD-ROM como instrumento de aprendizagem significativa sobre a Bioespeleologia Sergipana. **Revista Electrónica de Investigación em Educación na Ciencias** 4 (2): 39-47.

Donato CR, Oliveira AGA, Macedo HS, Donato RR, Silva MR (2018) **Protegendo as cavernas do Brasil**. Brasília: ICMBio/CECAV.

Donato CD, Oliveira AGA (2019) Da escuridão ao conhecimento: biologia subterrânea como ferramenta de educação ambiental. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 35, 2019. Bonito. **Anais...** Campinas: SBE, 2019. p.445-451. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe\\_445-451.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_445-451.pdf)>.

EGRIC – Espeleo Grupo Rio Claro (2021a) **O que é caverna? Desmistificação e aspectos físicos de uma caverna**. Disponível em: <<https://irp.cdn-website.com/202813e1/files/uploaded/CARTILHA1-O-QUE-%C3%89-CAVERNA-ATUALIZADA.pdf>> . Acesso em: 17 Set. 2021.

EGRIC – Espeleo Grupo Rio Claro (2021b) **O que é espeleologia? Espeleologia como ciência e sua história**. Disponível em: <<https://irp.cdn-website.com/202813e1/files/uploaded/Cartilha%202%20-%20que%20%C3%A9%20Espeleologia.pdf>> . Acesso em: 17 Set. 2021.

Ferreira RL (2005) A vida subterrânea nos campos ferruginosos. **O Carste** 3(17):106-115.

Ferreira RL, Martins RP (2001) Cavernas em risco de ‘extinção’. **Ciência Hoje** (29):20–28.

Ferreira RL, Gomes FTMC, Silva MS (2008) Uso da cartilha “Aventura da vida nas cavernas” como ferramenta de educação nas atividades de turismo em paisagens cársticas. **Pesquisas em Turismo e Paisagens Cársticas** 1 (2): 145-164. Disponível em: <[http://www.sbe.com.br/ptpc/ptpc\\_v1\\_n2\\_145-164.pdf](http://www.sbe.com.br/ptpc/ptpc_v1_n2_145-164.pdf)>.

Ferreira RL, Prous X, Bernardi LFO, Souza-Silva M (2010) Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e impactos. **Rev. Bras. Espeleol.** 1: 25-51.

Ferreira RL, Gonçalves LV, Raposo TM, Morgado AC, Neto VC (2014) Da formação da caverna à formação do educador. **Revista Brasileira de Espeleologia** 1 (4): 1-9.

Fisër, C.; Zagamajster, M.; Ferreira, R.L. (2013) Two new Amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. **Systematics and Biodiversity** 11:2, 117-139.

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

Hoch H, Ferreira RL (2013) *Potiguara troglobia* gen. n., sp. n.–first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). **Dtsch Entomol Z** 60(1)33–40.

IBAMA/CECAV – Centro Nacional de Estudos, Proteção e Manejo de Cavernas (2004). **Almanaque da Turma do Dinho: Vamos visitar uma caverna!!**. Brasília: IBAMA.

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.

Mammola S, Cardoso P, Culver DC, Deharveng L, Ferreira RL, Fišer C, ... & Isaia M (2019) Scientists' warning on the conservation of subterranean ecosystems. **BioScience** 69(8): 641-650.

Morgado AC, Ferreira RL, Neto VC (1996) Como ensinar espeleologia em escola de 1º e 2º graus? **O carste** 8 (3) 65.

Nascimento GM, Sousa TBB, Arnan X, de Lima RLFA, Ribeiro EMS (2020) A cartilha como instrumento de apoio didático: uma abordagem sobre os invertebrados da Caatinga. **Revista Brasileira De Educação Ambiental (RevBEA)** 15(6): 17-51.

Oliveira AGA, Donato CR, Dantas MAT (2011) V Encontro do Meio Ambiente: uma prática educativa para a sensibilização da importância da conservação do ambiente cavernícola. In: V Colóquio Internacional Educação e Contemporaneidade, 2011, São Cristóvão-SE, **Anais**. São Cristóvão-SE: Universidade Federal de Sergipe, 2011. p. 1-11.

Pinheiro MAA, Santos CMH, Wunderlich AC, Milão-Silva F, Peres-Costa WC (2010) Educação ambiental sobre manguezais na baixada santista: uma experiência da UNESP/CLP. **Revista Ciência em Extensão** 6(1): 19-27.

Rabelo LM, Souza-Silva, M, Ferreira RL (2018) Priority caves for biodiversity conservation in a key karst area of Brazil: comparing the applicability of cave conservation indices. **Biodivers Conserv** 27(9): 2097-2129. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1554-6>.

Ramos ELP, Moura RGF, Macedo MM, Siqueira LHC, Sposito NEC, Kataguirí VS (2012) Uma abordagem lúdica dos animais peçonhentos no ensino fundamental. **Revista Em Extensão** 11(2).

Santos AJ, Ferreira RL, Buzatto BA (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), e63616.

Simões MH, Souza-Silva M, Ferreira RL (2014) Cave invertebrates in northwestern Minas Gerais state, Brazil: endemism, threats and conservation priorities. **Acta Carsologica** 43: 159-174.

Silva TC, Medeiros PM, Araujo TAS, Albuquerque UP (2010) Northeastern Brazilian students' representations of Atlantic Forest fragments. **Environment. Development and Sustainability** 12 (2): 195-211.

Silva TC, Chaves LS, Albuquerque UP (2018) O que é percepção ambiental?. In: ALBUQUERQUE, U.P. **Introdução à Etnobiologia**. 2 ed. Recife, NUPEEA. p. 83-88.

Silva MS, Ferreira RL, Damasceno RC (2014) Cavernas e o desenvolvimento de práticas no estudo de ciências: um estudo com alunos do sexto ano escolar. **Revista Brasileira de Ensino de Ciência e Tecnologia** 7(3).

Souza-Silva M, Martins RP, Ferreira RL (2015) Cave conservation priority index to adopt a rapid protection strategy: a case study in Brazilian Atlantic rain forest. **Environmental management** 55(2), 279-295.

Trindade OSN, Silva Júnior JC, Teixeira PMM (2012) Um estudo das representações sociais de estudantes do ensino médio sobre os insetos. **Revista Ensaio** 14 (3): 37-50.

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

Van-Beynen P, Brinkmann, R., Van Beynen K (2012) A sustainability index for karst environments. **Journal of Cave and Karst Studies** 2(74): 221-234.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este é o primeiro trabalho de filogeografia comparada de invertebrados troglóbios na Caatinga, e identificamos extensa diversidade de linhagens crípticas em praticamente todos os táxons estudados. Enquanto Cirolanidae sp.1 constitui uma única linhagem, identificamos três Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) para Cirolanidae sp.2, cinco para *Potiberaba*, e sete para *Kinnapotiguara*. Essas linhagens crípticas estão distribuídas de acordo com as microbacias (táxons aquáticos) e lajedos (*Kinnapotiguara*).

Embora o Parque Nacional da Furna Feia seja efetivo ao abrigar cavernas com parte da distribuição de Cirolanidae sp.1, uma UTO de Cirolanidae sp.2 e duas de *Potiberaba*, as demais linhagens ocorrem em áreas expostas a diversas ameaças antrópicas e podem ser consideradas ameaçadas de extinção. Com base na distribuição das linhagens e categorias de ameaça, identificamos duas áreas prioritárias para conservação, 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. Inserido na principal área prioritária, 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 educativa “Vida nas caveRNas”, com foco na fauna cavernícola do oeste do Estado do Rio Grande do Norte, particularmente espécies troglóbias endêmicas e sua história evolutiva. 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.

Como um dos resultados práticos deste trabalho, parte dos dados foi utilizada no II Ciclo de avaliação do Risco de Extinção da Fauna Brasileira, coordenado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, mais precisamente na avaliação do estado de conservação dos invertebrados troglóbios do Brasil. A oficina de avaliação foi realizada entre os dias 21 e 25 de maio de 2018, e as oficinas de validação concluídas no início de 2019. Em ambas oficinas foram utilizados os dados moleculares disponíveis à época, resultantes deste trabalho, para a primeira avaliação de *Potiberaba porakuara* e *Kinnapotiguara troglobia*, contribuindo para uma avaliação mais precisa do estado de conservação dos táxons. Apesar da etapa técnica ter sido concluída, tais espécies

continuam oficialmente não avaliadas até que sejam publicadas as novas portarias com as listas das espécies ameaçadas pelo Ministério do Meio Ambiente.

Apesar dos resultados promissores, o trabalho continua em andamento. Está em andamento o sequenciamento de outros marcadores moleculares, mitocondriais e nucleares, para todos os táxons-alvo. O sequenciamento está sendo realizado em parceria com o Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS), em Belém/PA. Essa etapa sofreu atraso em função da pandemia de Covid-19, pois o laboratório ficou praticamente paralisado entre março e setembro de 2020 e atualmente ainda há restrições de acesso e circulação de pesquisadores.

Além disso, embora tenha sido possível a montagem de bibliotecas NGS de alguns indivíduos de todos os táxons-alvo, mais uma vez a pandemia de Covid-19 impossibilitou não só a montagem de novas bibliotecas como também o treinamento no ITV para tratamento e análise dos dados.

Embora não tenha sido possível a inclusão de análises multilocus e genômicas nesta tese, a parceria com o ITV permitirá a continuidade do trabalho e os dados poderão ser utilizados em futuros artigos, inclusive vinculados aos projetos de alunos de mestrado e doutorado que estão agora trabalhando com taxonomia integrativa de alguns dos táxons troglóbios (cirolanídeos e anfípodas).

Um dos principais resultados deste trabalho é justamente a incorporação de outros discentes às pesquisas envolvendo taxonomia integrativa e filogeografia de invertebrados cavernícolas. A partir desta tese de doutorado se somaram outros projetos, e atualmente há mais uma tese (envolvendo taxonomia integrativa de Cirolanidae) e três dissertações em andamento, uma com taxonomia integrativa de *Potiberaba*, uma de colêmbolos do gênero *Trogolaphysa* (estas duas provavelmente terão continuidade com projetos de doutorado) e outra com filogeografia e bioacústica de *Endecous* (Orthoptera: Phalangopsidae). Essas pesquisas aprofundarão o conhecimento sobre os ambientes subterrâneos e seus habitantes, e possivelmente ampliarão a já destacada relevância do patrimônio espeleológico potiguar.



**TESE DE DOUTORADO  
JUNHO DE 2021**