



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO

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

Matheus Arthur Lúcio da Rocha

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, Julhode 2021

Matheus Arthur Lúcio da Rocha

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Sistemática e Evolução.

Orientador: Sergio Maia Queiroz Lima.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - Centro de Biociências - CB

Rocha, Matheus Arthur Lúcio da.

Taxonomia iterativa de crustáceos troglóbios do gênero *Potiberaba* Fier, Ząmajster & Ferreira 2013 (Crustacea: Amphipoda) na Caatinga / Matheus Arthur Lúcio da Rocha. - 2021. 66 f.: il.

Dissertação (mestrado) - 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.

1. Genética - Dissertação. 2. Morfologia - Dissertação. 3. Ambiente subterrâneo - Dissertação. I. Lima, Sergio Maia Queiroz. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

Elaborado por KATIA REJANE DA SILVA - CRB-15/351

Matheus Arthur Lúcio da Rocha

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Sistemática e Evolução.

Orientador: Sergio Maia Queiroz Lima.

Aprovado em: 30 de julho de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sergio Maia Queiroz Lima
(Orientador)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Cesar de Paiva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. André Resende de Sena
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde realizei a maior parte da graduação e agora estou finalizando o doutorado; instituição pública de alta qualidade da qual sinto muito orgulho de fazer parte. Também agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução, seu corpo de docente, e especialmente a Gilmara, pela atenção e por sempre ser prestativa em ajudar os alunos do PPG; e a CAPES, pela bolsa de estudos concedida ao longo dos dois anos de doutorado.

Agradeço a Diego Bento, por todas as oportunidades que me ofereceu ao longo do doutorado, oportunidades que me fizeram evoluir de forma pessoal e profissional. Agradeço também ao meu orientador Sergio Maia, por toda paciência nesses dois anos de orientação, por todo compartilhamento de conhecimento, e pelo companheirismo como um amigo, e não só como orientador. Um obrigado imenso também para Rafaela Bastos e Rodrigo Lopes (Drops), que me salvaram todas as vezes que precisei de ajuda na Universidade Federal de Lavras, a colaboração de vocês foi de suma importância para o bom andamento do trabalho. Além disso, agradeço a toda equipe do Instituto Tecnológico Vale (ITV) por todo suporte laboratorial e pessoal.

Agradeço aos meus amigos de graduação, que hoje se tornaram amigos pra vida, Alana Tamires, Geovan Junior, Raynara Machado, Holda Ramos e Lara Porpino, por sempre darem apoio nos momentos ruins, e ajudando nas comemorações dos momentos bons. Gostaria de agradecer também a todos os integrantes do Laboratório de Ictiologia Sistemática e Evolução e do Grupo de Ecologia e Fisiologia de Animais Aquáticos, pessoas que conheci ainda no início da graduação, em 2014, e que até hoje fazem parte dos meus amigos mais próximos, que em muitos momentos foram família que eu não tenho aqui em Natal, e que eu só posso agradecer por todo apoio em mais um fim de ciclo acadêmico.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao meu pai (Moacir), e minha irmã (Milena), por todo o apoio durante todo meu tempo na academia. Agradecer ao meu namorado por todo o apoio nos momentos difíceis, principalmente nessa reta final em meio a todo o caos causado pela pandemia. E não poderia deixar de agradecer ao meu cachorro Thorin por ter sido em vários momentos meu melhor amigo e companheiro, me ajudando a manter a sanidade.

Resumo

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

Palavras-chave: Mesogammaridae, Crustáceos Subterrâneos, Morfologia, Genética, Formação Jandaíra

Abstract

Underground systems can be found in several mineral formations, sheltering a fauna with different life strategies, which together can use the underground environment permanently or temporarily. Among these inhabitants, the troglobites stand out, a group that includes organisms that present a series of ecological, physiological, morphological and behavioral adaptations associated with the subterranean environment. In Brazil, the troglobite fauna has been described with greater intensity in the last two decades, with the prospecting of new locations and the integration of different analytical tools. Despite this, the South and Southeast regions still stand out to the detriment of the others, concentrating most of the taxonomic, ecological and genetic studies of troglobite organisms. However, the Northeast, especially the state of Rio Grande do Norte (RN), has been standing out in the knowledge of this fauna, with the discovery of new species of troglobite invertebrates, such as crustaceans, flatworms and insects. Among the new organisms described in the RN is the genus of amphipods *Potiberaba*, monotypic and endemic to caves in the region, which for seven years presented a distribution restricted to the type locality. After new expeditions, specimens were recorded in eleven more locations, and whose molecular data indicated possible new species in the region's caves. Until then, the hypothesis was based only on delimitations using a mitochondrial marker. Thus, through an integrated approach between molecular (including nuclear markers) and morphological tools, the study proposed to evaluate the convergence between the different information to support the hypothesis of a species complex, as well as to identify morphological characters capable of distinguishing them, and at the end, propose the description of the new species of *Potiberaba*. Through an iterative approach between morphological information and molecular markers (cox1 and 28S), the study proposes the existence of five allopatric species, of which four have a restricted distribution, with low genetic and morphological diversity, while *P. porakuara* is widely found in the south of the Jandaíra Formation. The study also indicated that in addition to genetic divergences, the lineages can be identified through morphological characters with a high accuracy rate, showing that the species richness of this formation is underestimated.

Keywords: Mesogammaridae, Subterranean Crustaceans, Morphology, Genetics, Jandaíra Formation

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de localidades de *Potiberaba* na região Oeste da Caatinga do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Linhas azuis claras indicam hidrografia. A área cinza escura indica a formação cárstica Jandaíra, enquanto a verde indica os limites Parque Nacional da Furna Feia, círculos representam locais de ocorrência de *P. porakuara*, hexágonos, quadrados, pentágonos e losangos, representam áreas de ocorrência das novas espécies. **1** - Caverna Furna Feia (*Potiberaba* sp. nov. 1), **2** - Caverna Pedra Lisa (*Potiberaba* sp. nov. 2), ambas no PNFF, **3** - Olho D'água da Onça (*Potiberaba* sp. nov. 3), **4** - Caverna Crotes (*Potiberaba* sp. nov. 4), **5** - Caverna Poço Feio, **6** - Caverna da Água, **7** - Olho D'água da Furna, **8** - Caverna Troglóbios, **9** - Olho D'Água do Tetéu, **10** - Caverna Boa, **11** - Gruta Três Lagos (localidade tipo), **12** - Olho D'água do Cedro.

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

Figura 3- Exemplos capturados em cavernas da formação do calcário Jandaíra. **A**- *Potiberaba* sp. nov. 1 (Furna Feia), **B**- *Potiberaba* sp. nov. 2 (Pedra Lisa), **C**- *Potiberaba* sp. nov. 4 (Olho d'água da Onça), **D**- *Potiberaba porakuara* (Olho d'água do Teteu).

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

Figura 5. **A**- Árvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTT e BPP) para as linhagens do gênero *Potiberaba* utilizando o marcador mitocondrial *cox 1*, os círculos coloridos representam as diferentes linhagens, os valores próximos aos ramos indicam o suporte obtido para cada um deles. **B**- Arvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTT e BPP) para as linhagens de *Potiberaba* utilizando o marcador nuclear 28S, as cores representam as diferentes linhagens seguindo o mesmo padrão da árvore **A**.

Figura 6. **A** - Rede de haplótipo para o gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (*cox1*), **B** - rede de haplótipos para o gene nuclear 28S. Ambos os conjuntos de dados são de localidade de *Potiberaba* sp. nov. 1, 2, 3 e 4, além de *Potiberaba porakuara*. Em preto *Potiberaba* sp nov. 1, em rosa *Potiberaba* sp. nov. 2, amarelo *Potiberaba* sp. nov.3, em azul *Potiberaba* sp. nov. 4, e em vermelho *Potiberaba porakuara*.

Figura 7. **A**- Análise de Componentes Principais (PCA) com as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas: : UP3 = Pedúnculo do urópodo III, CFA = Comprimento do flagelo acessório, CA1 = Comprimento da antena I, NAA1 = Número de artículos da antena

I, P1A1 = Comprimento do pedúnculo I da antena I, P2A1 = Comprimento do pedúnculo II da antena I, P3A1 = Comprimento do pedúnculo III da antena I, U3RE = Comprimento do ramo externo do urópodo III, U3RI = Comprimento do ramo interno do urópodo III, U2RE = Comprimento do ramo externo do urópodo II, U2RI = Comprimento do ramo interno do urópodo II, U2P = Comprimento do pedúnculo do urópodo. **B-** Análise de Variação Canônica (CVA), entre as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas aplicadas na PCA.

Figura 8- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 1. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C** e **D-** Mandíbula.

Figura 9- Pereópodes I – V de *Potiberaba* sp. 1.

Figura 10- Gnatópodes I e II de *Potiberaba* sp. 1. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

Figura 11- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 1. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Figura 12- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 2. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C-** **E** mandíbula e molar.

Figura 13- Pereópodes I – V de *Potibaraba* sp. 2.

Figura 14- Gnatópodes I e II de *Potiberaba* sp. 2. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

Figura 15- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 2. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Figura 16- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 3. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C-** **D** mandíbula e molar.

Figura 17- Pereópodes I – V de *Potibaraba* sp. 3.

Figura 18- Gnatópodes I e II de *Potiberaba* sp. 3. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

Figura 19- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 3. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Figura 20- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 4. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C-** **D** mandíbula e molar.

Figura 21- Pereópodes I – V de *Potiberaba* sp. 4.

Figura 22- Gnatópodes I e II de *Potiberaba* sp. 4. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

Figura 23- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 4. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Lista de Tabelas

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

Tabela 2- Locais de amostragem de *Potiberaba* e distribuição haplotípica (Hap) para o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (*cox1*), e para o gene nuclear 28S. Os números em HapCOXI e Hap28S, representam os haplótipos encontrados para cada gene em cada linhagem.

Tabela 3- Valores de significância obtidos através da CVA (Análise de variação canônica) em comparações intra e interespecíficas para o conjunto de dados morfológicos de *Potiberaba*. Valores inferiores a 0.05 foram considerados significativos na análise.

Sumário

Introdução	11
Materiais e Métodos	15
Área de estudo.....	15
Captura dos espécimes.....	17
Processamento molecular	18
Morfometria tradicional.....	21
Resultados	23
Genética de populações	23
Filogenia e delimitação de espécies	24
Diversidade haplotípica	25
Análises morfológicas	27
Descrição de novas espécies.....	30
Discussão	58
Referências	61

Introdução

Cavernas são cavidades subterrâneas naturais, componentes de um tipo de relevo denominado ‘carste’ (Poulson & White 1969), as quais são formadas pela ação do intemperismo químico e/ou mecânico da rocha matriz, que podem apresentar diferentes origens minerais, como calcário, formações ferríferas, mármore, dentre outras. Além disso, a moldagem e deposição de diversas feições determinam as peculiaridades geológicas e biológicas desses ambientes (White & Culver 2011). Os sistemas subterrâneos (ambientes hipógeos) se distinguem do ambiente superficial (epígeo) principalmente pela ausência total de luz em zonas profundas, e maior tendência a estabilidade ambiental, especialmente em características como temperatura e umidade (Culver 1982, Jones 1992), que podem variar de acordo com peculiaridades de cada local, tamanho e quantidade de entradas da caverna, e variações ambientes que ocorrem no ambiente epígeo (Culver & White 2005).

A ausência permanente de luz dentro das cavernas, impede o estabelecimento e reprodução de organismos fotossintetizantes que exercem a função de produtores primários em outros ecossistemas (Silva *et al.* 2019). Dessa forma, os recursos alimentares disponíveis para a fauna desses ambientes geralmente têm origem alóctone (Schneider *et al.* 2011, Souza-Silva *et al.* 2011). Essa matéria é importada de fontes externas de forma contínua, ou temporária, por meios físicos como vento e chuva e/ou agentes biológicos (Culver 1982, Howarth 1983, Ferreira *et al.* 1999), conectando assim os ecossistemas subterrâneos aos superficiais, e influenciando a abundância e diversidade da fauna subterrânea (Culver 1982, Culver & White 2005, Souza-Silva *et al.* 2011, Simões *et al.* 2015). Além de se conectarem por meio da importação da matéria orgânica, como anteriormente citado, os sistemas epígeos e hipógeos podem apresentar conexões por meio da fauna (Prous 2005), de modo a abrigar organismos que transitam entre os dois ambientes, e linhagens epígeas e hipógeas com estreitas relações de parentesco (Souza-Silva *et al.* 2011, Simões *et al.* 2015).

Nos sistemas subterrâneos é possível encontrar uma vasta gama de vertebrados e invertebrados, que habitam as diferentes zonas e micro-habitats (Ferreira *et al.* 2016). Esses organismos, apesar de utilizarem o ambiente cavernícola, apresentam diferentes estratégias na utilização deste (Galan *et al.* 2006). Dentre os organismos que habitam esses sistemas, estão os troglófilos, espécies que podem completar todo seu ciclo de vida dentro ou fora do ambiente cavernícola, os organismos troglógenos, que podem ser encontrados em diferentes zonas das cavernas, mas necessariamente precisam sair do ambiente subterrâneo para completar seu ciclo de vida (Vadell 2003). Além dos troglófilos e troglógenos, o ambiente subterrâneo abriga um grupo de organismos exclusivamente cavernícolas, que necessariamente completam todo seu

ciclo de vida dentro das cavernas, os organismos troglóbios. As espécies troglóbias apresentam um conjunto de caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamentais selecionados para manutenção do *fitness* e homeostase em cavernas, denominado troglomorfo (Culver 1982).

Esses organismos já foram registrados em diversos tipos de cavernas, de formação calcária, ferrífera, mármore, em todas as zonas e micro-habitats presentes nos sistemas subterrâneos no mundo todo (Christian 1987, Porco *et al.* 2013 Hellman *et al.* 2018, Rendoš *et al.* 2018, Silva *et al.* 2020, Pellegrini *et al.* 2020), com um aumento significativo de novas espécies sendo descritas nas duas últimas décadas (Fišer *et al.* 2013), advindo do incremento de novas ferramentas para detecção e descrição de espécies, além de expedições que abrangem área até então inexploradas (Hou *et al.* 2002, Li *et al.* 2006, Naruse *et al.* 2008, Porco *et al.* 2013, Asenjo *et al.* 2018, Smith *et al.* 2020).

As características geológicas de algumas regiões do Brasil, propícias a formação de cavernas, e atualmente mais exploradas por pesquisadores, vem revelando um grande número de cavidades, tornando ainda mais expressivo o número de cavernas presentes na América do Sul (Travassos 2008, 2013), associado a isso, um aumento expressivo no número de novas espécies descritas a cada ano (Baptista *et al.* 2002, Souza *et al.* 2010, Kaczmarek *et al.* 2014, Santo *et al.* 2020, Santos *et al.* 2021), indicando que a biodiversidade subterrânea do país pode ser até dez vezes maior do que é conhecida atualmente, em especial para fauna troglóbia (Lóbu *et al.* 2009).

Apesar do avanço no conhecimento desses ambientes, e consequentemente de sua biodiversidade, regiões como Sul e Sudeste concentram cerca de 70% dos estudos ecológicos, taxonômicos, genéticos e comportamentais com esses organismos no Brasil (Silva *et al.* 2011, Maia *et al.* 2013, Iniesta *et al.* 2013, Ferreira *et al.* 2005). Na região Nordeste, o estado do Rio Grande do Norte (RN), vem se destacando quanto ao número de novas cavernas descobertas nos últimos anos (Bento *et al.* 2011, 2020), colocando o estado no quarto lugar em número de cavidades no Brasil, tendo ultrapassado o número 1.000 no ano de 2019 (CECAV 2020). Além disso, após estudos recentes, o estado vem ganhando notoriedade quanto ao número de novas espécies troglóbias, de platelmintos até grupos de crustáceos como isópodes e anfípodes (Fišer *et al.* 2013, Hellman *et al.* 2019, Bento *et al.* 2020).

No RN, espécies troglóbias são encontradas em cavernas na região Oeste da Caatinga, localizadas na formação Jandaíra, constituída por um afloramento calcário até então conhecido por abrigar um rico depósito fóssil de organismos marinhos, e a maior concentração de cavernas do estado (Senra 1997, Cassab 2003, Souza-Lima, *et al.* 2007; Barreiro & Senra 2007, Ferreira

et al. 2010). Além disso, parte das cavernas da região encontram-se inseridas no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF).

Estudos como os realizados por Ferreira *et al.* 2010 e Bento *et al.* (2011), já indicavam que a região tinha grande potencial para abrigar uma diversa fauna troglóbia, confirmada após publicações como as de Xing *et al.* (2013), com a descrição de uma nova espécie de cigarra troglóbia, Fišer *et al.* (2013) com a descrição de um novo gênero e duas novas espécies de anfípodes troglóbios, Leal *et al.* (2014) com um novo gênero e duas novas espécies de planárias, Azara *et al.* (2014), com uma nova espécie de quilópode, e Souza *et al.* (2018), com cinco novas espécies de planárias.

Em um trabalho recente, Bento *et al.* (2020) indicaram que a diversidade local pode ser ainda maior quando outras ferramentas para detecção de novas linhagens são utilizadas, como os marcadores moleculares, evidenciando a necessidade de estudos que integrem diferentes ferramentas analíticas para resoluções taxonômicas mais robustas. Através de análises moleculares de um marcador mitocondrial detectou-se que um dos grupos de troglóbios, os anfípodes do gênero *Potiberaba* (Fišer *et al.* 2013), poderiam constituir um complexo de espécies.

O gênero até então monotípico, contém apenas *Potiberaba porakuara*, é considerado um relictó oceânico da região, e pode ter surgido a partir da colonização das cavernas por organismos marinhos durante em eventos de elevação do nível do mar, durante os períodos do Cretáceo (80 M.a.) e Mioceno (23 M.a.). Após a regressão oceânica, representantes marinhos foram aprisionados nos sistemas subterrâneos da região hoje conhecida como Caatinga, dando origem ao grupo *Potiberaba*, padrão biogeográfico singular na fauna cavernícola brasileira (Ferreira *et al.* 2010). Além disso, outra característica tida como marcante para o grupo, presente em poucos anfípodes epígeos e hipógeos, é a hipótese de que os espécimes se reproduzam por partenogênese, desde a sua descrição em 2013 e até os dias atuais, apenas fêmeas são registradas na espécie, em sua maioria ovígeras.

Até o trabalho realizado por Bento *et al.* (2020), acreditava-se que a distribuição do gênero, e sua única espécie, era restrita a localidade tipo, a caverna Três Lagos. Após o estudo, constatou-se que *P. porakuara* e as possíveis novas espécies do gênero, são encontradas em diversas cavernas da região de forma simpátrica com outras espécies de crustáceos troglóbios, com *P. porakuara* sendo a mais bem distribuída, e a mais diversa do ponto de vista genético (Bento *et al.* 2020). Os espécimes foram encontrados ocupando locais com características distintas, desde cavernas com água permanente ao longo do ano, variando em fluxo entre os períodos de chuva e seca, até cavidades que secam completamente durante o período de seca,

poças, raízes e gramíneas aquáticas, variando também quanto ao tamanho populacional, onde *P. porakuara* também se diferencia pela alta abundância de indivíduos na maior parte das cavernas que habita.

Apesar da detecção de novas linhagens através de um marcador mitocondrial, essas não haviam sido avaliadas sob outros aspectos capazes de distingui-las, como diferenciação morfológica e ecológica, e a utilização de outros marcadores moleculares para corroborar a hipótese de um complexo de espécies. Para testar tal hipótese, o estudo se propôs a utilizar uma abordagem iterativa entre informações morfológicas e genéticas das linhagens, com base nas delimitações propostas por Bento *et al* (2020), e os caracteres morfológicos diagnósticos descritos por Fišer *et al* (2013), avaliando se as divergências genéticas propostas em estudos anteriores se refletem em diferenciação morfológica entre as linhagens. Associado a isso, incorporamos novas informações moleculares através da utilização de um marcador nuclear, sendo possível assim comparar as informações obtidas para cada gene e as informações morfológicas.

Materiais e Métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido em um conjunto de cavernas localizadas na formação do calcário Jandaíra, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Figura 1). As cavernas onde exemplares de *Potiberaba* foram coletados, apresentam feições hidrológicas que vão desde poças formadas por gotejamento, através da infiltração da água superficial na formação calcária, pequenos córregos que variam de vazão dependendo do ciclo pluviométrico, interligando os sistemas subterrâneos durante a estação chuvosa, e secando total ou parcialmente na estação seca. Além disso, essas cavidades podem apresentar emaranhados de raízes que penetram a rocha alcançando a água no interior das cavernas, e resíduos vegetais em decomposição que são carregados para o interior dos sistemas durante as chuvas, e são utilizados como fonte de alimento ou abrigo por anfípedes, e outros organismos aquáticos (Figura 2).

As cavernas amostradas são as mesmas onde Bento *et al* (2020) conduziram seu estudo: Furna feia (FUF), Pedra lisa (PDL), Olho d'água da Onça (ODO), Crotas (CRO), Poço Feio (PFE), Caverna da Água (CAG), Olho d'água da Furna (ODF), Troglóbios (TGL), Olho d'água do Tetéu (ODT), Caverna Boa (CBO), Três lagos (TLG), Olho d'água do Cedro (ODC). Dentre as localidades visitadas, as cavernas FUF e PDL, encontram-se protegidas no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF).

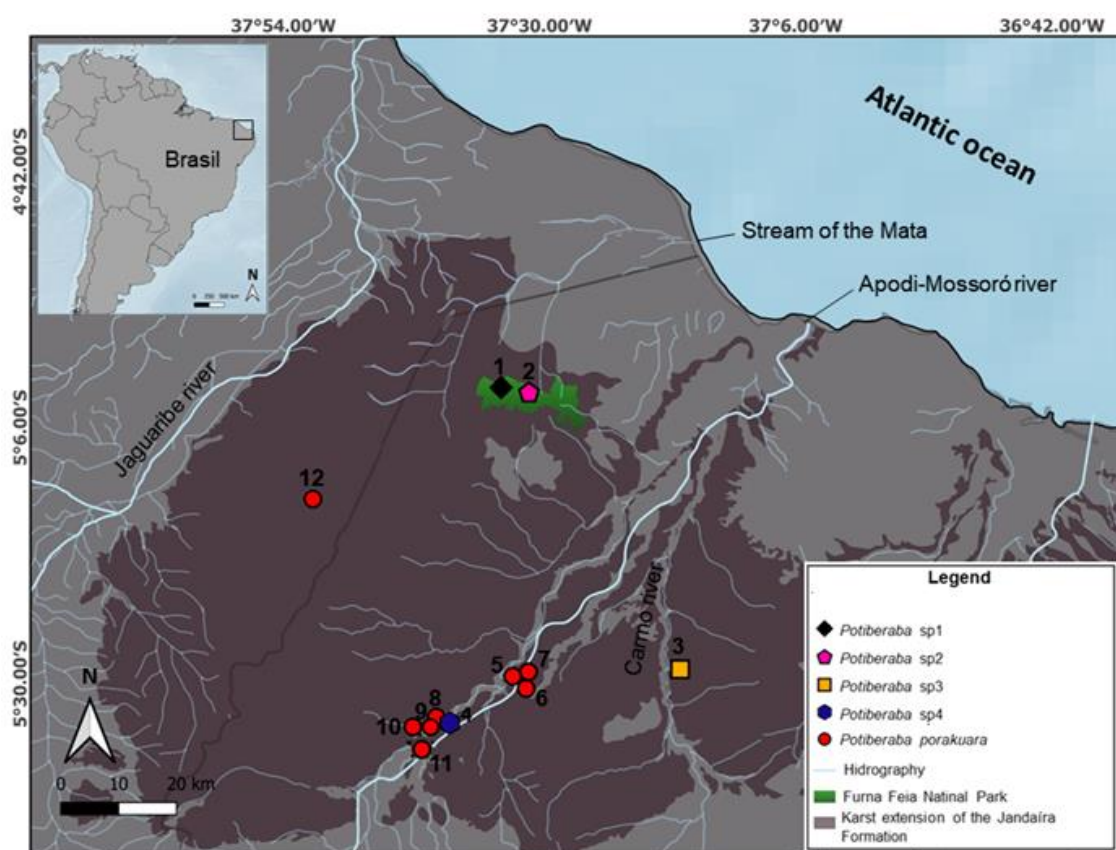


Figura I. Mapa de localidades de *Potiberaba* na região Oeste da Caatinga do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Linhas azuis claras indicam hidrografia. A área cinza escura indica a formação cárstica Jandaíra, enquanto a verde indica os limites Parque Nacional da Furna Feia, círculos representam locais de ocorrência de *P. porakuara*, hexágonos, quadrados, pentágonos e losangos, representam áreas de ocorrência das novas espécies. **1** - Caverna Furna Feia (*Potiberaba* sp. nov. 1), **2** - Caverna Pedra Lisa (*Potiberaba* sp. nov. 2), ambas no PNFF, **3** - Olho D'água da Onça (*Potiberaba* sp. nov. 3), **4** - Caverna Crotes (*Potiberaba* sp. nov. 4), **5** - Caverna Poço Feio, **6** - Caverna da Água, **7** - Olho D'água da Furna, **8** - Caverna Troglóbios, **9** - Olho D'Água do Tetéu, **10** - Caverna Boa, **11** - Gruta Três Lagos (localidade tipo), **12** - Olho D'água do Cedro.

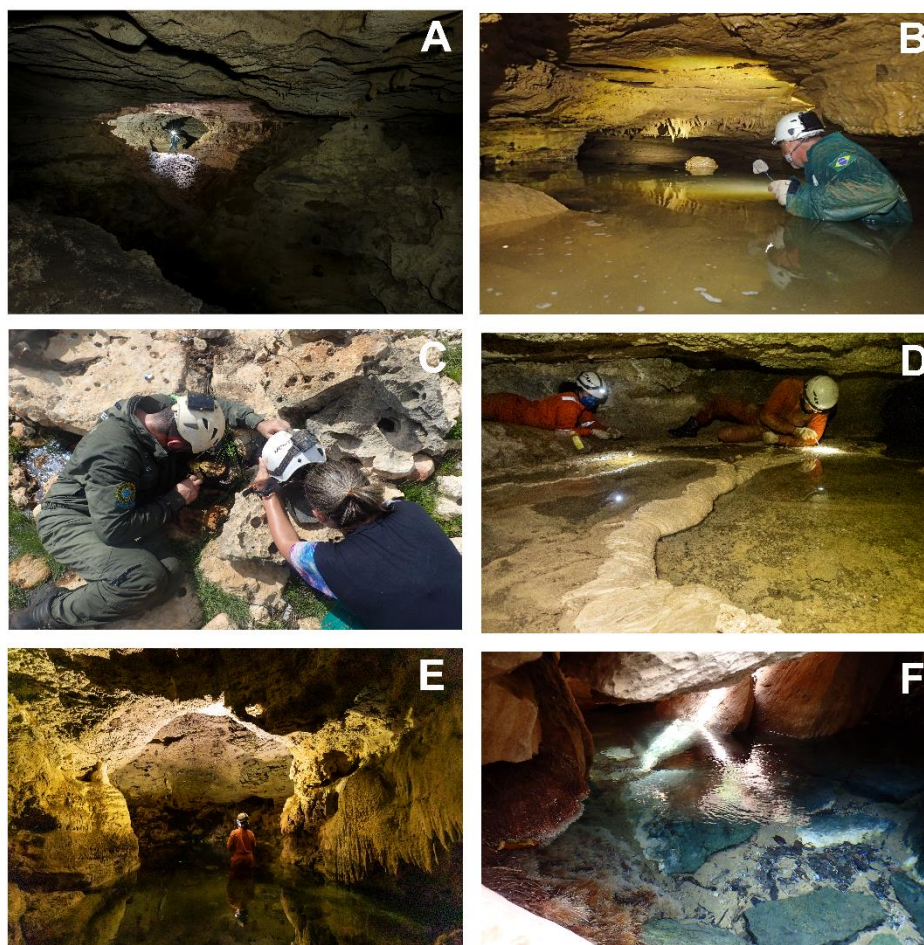


Figura 2- Localidades onde representantes do gênero *Potiberaba* foram amostrados. **A-** Caverna Furna Feia (*Potiberaba* sp. nov. 1), **B** – Caverna Pedra Lisa (*Potiberaba* sp. nov. 2), **C** – Olho d'água da Onça (*Potiberaba* sp. n. 3), **D-** Caverna Crotes (*Potiberaba* sp. nov. 4), **E** – Gruta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

Captura dos espécimes

Para obtenção dos espécimes, foi utilizado um puçá de tela para retirada dos anfípodes que se encontravam fixados às raízes no interior das cavernas, através de mergulhos livres e raspagem de material vegetal e sedimentar. Além disso, armadilhas do tipo covão também foram utilizadas. As armadilhas foram confeccionadas utilizando cilindros de plástico envolvidos por tela com abertura de 0.2mm entre nó, deixadas submersas nas cavernas por 48 horas, usando fígado bovino como iscas. Após esse período, foram retiradas e os espécimes coletados e acondicionados em tubos plásticos. Em seguida, todos os espécimes capturados passaram por processo de fixação em solução de etanol 100% e identificados segundo Fišer et al (2013) com base em caracteres morfológicos, separando os espécimes em morfogrupos, posteriormente as delimitações de linhagens realizadas por Bento *et al* (2020), também foram utilizadas para separação, gerando cinco grupos distintos, em seguida as amostras foram subdivididas, separando animais para análises morfológicas e moleculares. Posteriormente, sete exemplares de cada localidade foram dissecados sob estereomicroscópio com auxílio de alfinetes entomológicos e montados em lâminas contendo líquido de Hoyer para conservação das estruturas. As lâminas foram mantidas por 48 h em estufa a 50 °C para secagem do Hoyer e posteriormente vedadas com verniz. Por fim, as lâminas foram subdivididas em frações, tombadas e depositadas coleção de invertebrados aquáticos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte GEEFAA – UFRN, e na coleção de fauna subterrânea da Universidade federal do Lavras, no cento de estudos em biologia subterrânea (CEBS).

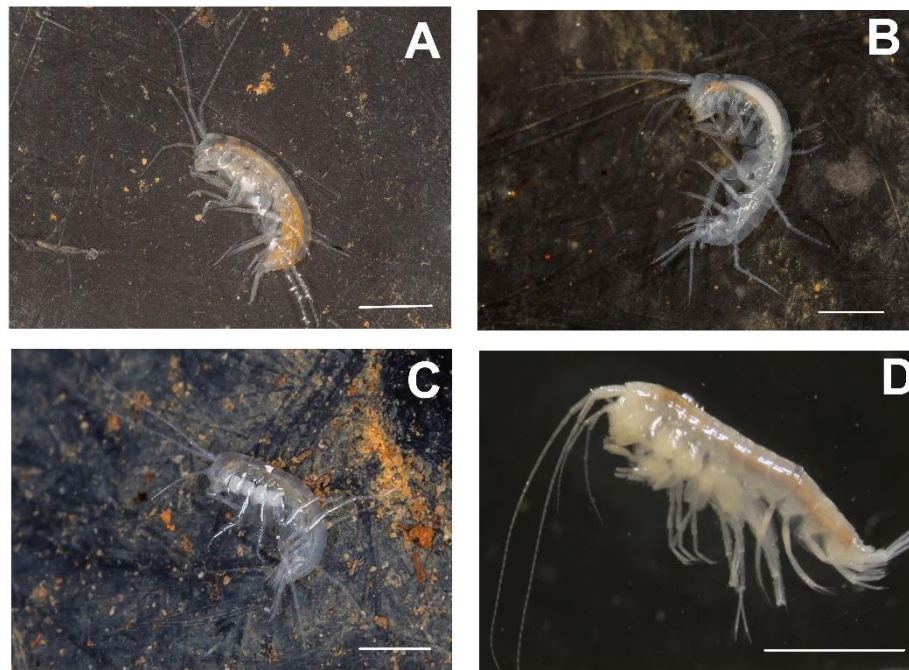


Figura 3- Exemplos capturados em cavernas da formação do calcário Jandaíra. **A-** *Potiberaba* sp. nov. 1 (Furna Feia), **B-** *Potiberaba* sp. nov. 2 (Pedra Lisa), **C-** *Potiberaba* sp. nov. 4 (Olho d'água da Onça), **D-** *Potiberaba porakuara* (Olho d'água do Teteu).

Processamento molecular

O DNA total foi extraído de indivíduos de cada linhagem de *Potiberaba* identificada por Bento *et al* (2020) seguindo o número amostral descrito na Tabela 1 para ambos os marcadores, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Foram obtidas sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*cox1*) e do RNA ribossomal subunidade 28S, amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* descritos por Folmer *et al* (1994) e Verovnik *et al* (2005). Para o gene *cox1*, a PCR seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C durante 4 min; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 45° C por 1 minuto extensão a 72° C durante 2 min e meio; e uma etapa final de extensão de 7 min a 72° C. Para o 28S as etapas foram: desnaturação inicial a 94° C durante 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos extensão a 72° C durante 1 minuto; e uma etapa final de extensão de 7 min a 72° C.

Todos os produtos de PCR foram primeiramente visualizados em gel de agarose 1,2% e posteriormente utilizados em uma reação de PCR de sequenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Após a amplificação, os produtos da PCR foram novamente purificados por precipitação em

EDTA/Acetato de sódio/etanol e analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3730-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Instituto tecnológico Vale, na cidade de Belém-PA.

Após a edição dos eletroferogramas, as sequências de consenso foram alinhadas usando ClustalW (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa MEGA 7.0, seguido por inspeção visual para ajustes finais. A partir da análise de distribuição de haplótipos realizada com o programa DNAsp v.5 (Librado & Rozas 2009) foi construída uma rede de haplótipos por meio do software PopArt (Leigh & Bryant 2015) utilizando algoritmo de parcimônia TCS Network, de maneira que permita visualizar os passos mutacionais dentro e entre as linhagens.

Para detectar a estrutura populacional das linhagens a partir do conjunto de dados de *cox1* e *28S*, utilizamos o Geneland no software R v. 3.1.4, que não necessita que as amostras sejam associadas a espécies potenciais a priori (Guillot *et al.* 2005). A análise Geneland foi baseada em um modelo de frequência não correlacionado, que é usado para delimitar agrupamentos de possíveis linhagens distintas (Pavón-Vázquez *et al.* 2018), com número populacional mínimo 1 e número populacional máximo 10. O modelo espacial foi selecionado para inferir o número de clusters em nove rodadas independentes usando 1.000.000 de iterações MCMC, das quais cada 1.000 foi retido. Posteriormente um burn-in de 200 foi aplicado e a corrida com o logaritmo médio mais alto de probabilidade posterior foi usada para calcular as probabilidades posteriores das populações.

As inferências filogenéticas Bayesianas (BI) foram realizadas individualmente para cada gene no *BEAST v. 2.1, utilizando amostras que representassem a diversidade haplotípica encontrada em cada localidade para todas as linhagens, dessa forma os seguintes parâmetros foram adotados: modelo de substituição como HKY+G e frequências de base como todos iguais, e sem sítios invariáveis. O tipo de relógio selecionado foi um relógio relaxado com taxa de distribuição normal, média de 0,01, com taxa de substituição de 0,07% M.a para *cox1* e 0,035% M.a para *28S* (Regier *et al.* 2005, Lins *et al.* 2015), e desvio padrão de 0,001. O modelo anterior da árvore foi definido como especiação com processo de Yule. A cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi executada com 20.000.000 gerações e amostrada a cada 2.000 gerações. Os outros parâmetros foram definidos como padrão. Para garantir a qualidade das simulações do MCMC, os valores ESS de pelo menos 200 foram verificados utilizando o Tracer 1.77 (Rambaut *et al.* 2018). Em seguida, treeAnnotator v. 1.10.2 foi usado para resumir os resultados do BEAST em uma única árvore com *burn-in* de 20% e um limite de probabilidade posterior de 0,5. Finalmente, a árvore final foi visualizada e editada em FigTree v. 1.4.4 (Rambaut 2018).

Para as delimitações de linhagens, os genes *cox1* e *28S* foram analisados separadamente, para cada gene quatro análises de delimitação de linhagem foram realizadas: ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) onde as maiores distâncias genéticas intraespecíficas devem ser inferiores a menor distância genética entre indivíduos de espécies diferentes (Puillandre *et al* 2012); GMYC (*Generalized Mixed Yule-Coalescent*) que usa a mudança na taxa de ramificação ao longo de uma árvore filogenética para detectar a altura em que os eventos de especiação se transformam em coalescente (Pons *et al* 2006); PTP (*Poisson Tree Process*), que remove a dependência de uma árvore ultramétrica precisa e usa o número de substituições de nucleotídeos ao invés de procurar o ponto de transição das derivações (Zhang *et al* 2013); e BPP (*Bayesian Phylogenetics and Phylogeography*) (Yang *et al* 2015), que testa todas as topologias de árvore de espécies possíveis, e também testa a hipótese de que qualquer combinação de duas ou mais espécies propostas poderia realmente pertencer a uma única espécie. Assim, ao contrário das versões anteriores do BPP, o fato de que a topologia da árvore das espécies pode mudar, elimina a preocupação de superestimar os limites das espécies (Leaché & Fujita 2010, Caviedes-Solis *et al* 2015). Uma árvore de máxima verossimilhança gerada no MEGA 7.0 com 1.000 foi usada como árvore de entrada para PTP, realizado no servidor online (<https://species.h-its.org/ptp/>) utilizando os parâmetros padrão. Árvores ultramétricas geradas no BEAST por inferência Baesiana a partir do conjunto de dados dos dois genes foram usadas como arquivo de entrada para as delimitações do GMYC, realizada no servidor online (<https://species.h-its.org/gmyc/>). As análises baseadas em distância foram realizadas através do (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>), com a largura de lacuna relativa de 1,0 e os parâmetros restantes sem alterações.

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

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

Morfometria tradicional

Foram utilizadas sete lâminas para cada espécie contendo as estruturas dissecadas de indivíduos de *Potiberaba sp. nov. 1*, sete de *Potiberaba sp. nov. 2*, sete de *Potiberaba sp. nov. 3*, sete de *Potiberaba sp. nov. 4*, e 31 de *Potiberaba porakuara*. As estruturas foram mensuradas sob estereomicroscópio com altura padronizada entre a lente e as lâminas, utilizando o software BellCapture na função de medida. Em seguida, as informações morfométricas foram submetidas a análises exploratórias seguindo protocolo proposto por Zuur (2010), verificando a normalidade, homoscedasticidade, presença de *outliers* e colinearidade. Após tratamento dos dados, variáveis que apresentaram colinearidade para o VIF (Fator de Inflação da Variável) acima de 3.0 foram excluídas das análises posteriores, assim como *outliers*. Desse modo, as 12 variáveis utilizadas foram: UP3 = Pedúnculo do urópodo III, CFA = Comprimento do flagelo acessório, CA1 = Comprimento da antena I, NAA1 = Número de artigos da antena I, P1A1 = Comprimento do pedúnculo I da antena I, P2A1 = Comprimento do pedúnculo II da antena I, P3A1 = Comprimento do pedúnculo III da antena I, U3RE = Comprimento do ramo externo do urópodo III, U3RI = Comprimento do ramo interno do urópodo III, U2RE = Comprimento do ramo externo do urópodo II, U2RI = Comprimento do ramo interno do urópodo II, U2P = Comprimento do pedúnculo do urópodo.

Em seguida, para observação de possíveis tendências de agrupamento, os dados foram plotados em uma análise de componentes principais (PCA) no software R. Posteriormente, para

avaliação da variação intra e interespecífica os dados foram testados através de uma análise de variação canônica (CVA), em seguida, os valores de comparação obtidos através da CVA foram utilizados para elaboração de uma matriz de confusão, agrupando indivíduos de acordo com o grau de similaridade morfológica.

Após a confirmação da distinção entre as espécies, os caracteres morfológicos utilizados por Fišer *et al* (2013) na descrição de *Potiberaba porakuara*, contagens e medições de estruturas, foram utilizados para descrever as quatro novas espécies do gênero.

Resultados

Genética de populações

A partir do conjunto de dados multiloci, contendo o gene mitocondrial *cox1*, e nuclear *28S*, o Geneland recuperou estruturação para cinco possíveis novas linhagens ($K=5$), indicando que a hipótese de um complexo de espécies para o gênero pode ser válida. Entretanto, a similaridade entre os picos que definem o número de possíveis linhagens, ($K=4$ e $K=5$) (Figura 4) levantou a necessidade de mais análises para definição de quantas linhagens poderiam ser descritas, de forma segura no presente trabalho. Dessa forma, os resultados obtidos através das análises posteriores serão utilizados na definição de quantas linhagens serão descritas ao final do estudo.

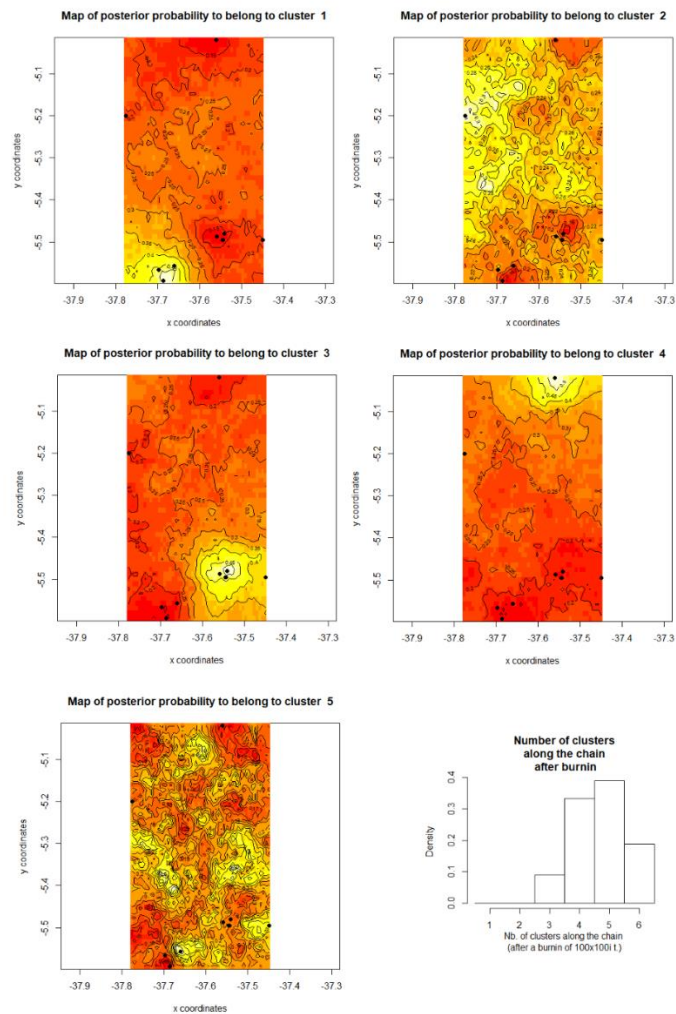


Figura 4. Mapas de probabilidade posterior para as possíveis novas linhagens de *Potiberaba*, gerados a partir de um conjunto de dados nucleares e mitocondriais. Cinco clusters distintos foram sugeridos para o conjunto de dados. Cores mais claras indicam maior probabilidade de estruturação genética.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

Filogenia e delimitação de espécies

As topologias recuperadas através das árvores filogenéticas com inferência bayesiana, divergiram entre genes em pontos como: suporte dos ramos, e relações de parentesco entre as quatro novas linhagens de *Potiberaba* e *P. porakuara*. A topologia recuperada para o gene *cox1*, indicou que *P. porakuara*, assim como *Potiberaba* sp. nov. 1, 2, 3 e 4, formam clados monofiléticos, com altos valores de suporte (acima de 95%) para os ramos, exceto para *Potiberaba* sp. n. 1 (Figura 5A). Para o gene nuclear *28s*, os clados que foram recuperados de modo geral não apresentaram suportes considerados significativos (acima de 0.9), exceto para separação de *Potiberaba* sp. nov. 3 dos outros grupos.

Além disso, as topologias diferem quanto aos clados que foram formados. Enquanto para *cox1*, *P. porakuara* e as quatro novas linhagens foram agrupadas em clado monofiléticos, para o gene nuclear, *Potiberaba* sp. nov. 4 não forma um clado monofilético, alocado dentro do grupo *P. porakuara*. As relações de parentesco para os dois genes também foram destoantes em alguns pontos, a topologia para *cox1* indica maior proximidade entre *Potiberaba* sp. nov. 3 e sp. nov. 2 enquanto para *28s*, *Potiberaba* sp. nov. 3 é classificado como grupo irmão de *Potiberaba* sp. nov. 1, para *cox1* observa-se maior proximidade entre *Potiberaba* sp. nov. 1 e o grupo *P. porakuara*, enquanto para o gene nuclear, *Potiberaba* sp. nov. 2 é o grupo mais aparentado a *P. porakuara*, que para *28s*, inclui *Potiberaba* sp. nov. 4. (Figura 5 AB).

As análises de delimitação de linhagens do conjunto de dados de *Potiberaba porakuara* e *Potiberaba* sp. nov. 1, 2, 3 e 4, para o gene mitocondrial *cox1* foram congruentes, exceto para ABGD, que indicou a existência de quatro linhagens, GMYC e PTP, ainda que fracionando em duas linhagens as amostras de *P. porakuara*, indicaram de forma similar a existência das outras quatro linhagens, similar a isso, BPP indicou a presença de quatro linhagens, entretanto, considerou todas as amostras de *P. porakuara* como uma única linhagem (Figura 5A). Já para o *28S*, os métodos não delimitaram *Potiberaba* sp. nov. 4 como uma linhagem distinta, sugerindo a existência de quatro, incluindo *Potiberaba* sp. nov. 4 dentro de *P. porakuara* (Figura 5A e 5B). De modo geral, as delimitações com ambos os genes indicam a presença de quatro ou cinco linhagens de *Potiberaba*, assim como observado no Geneland, com alta probabilidade dos clusters recuperados pelo Geneland serem de fato, espécies distintas.

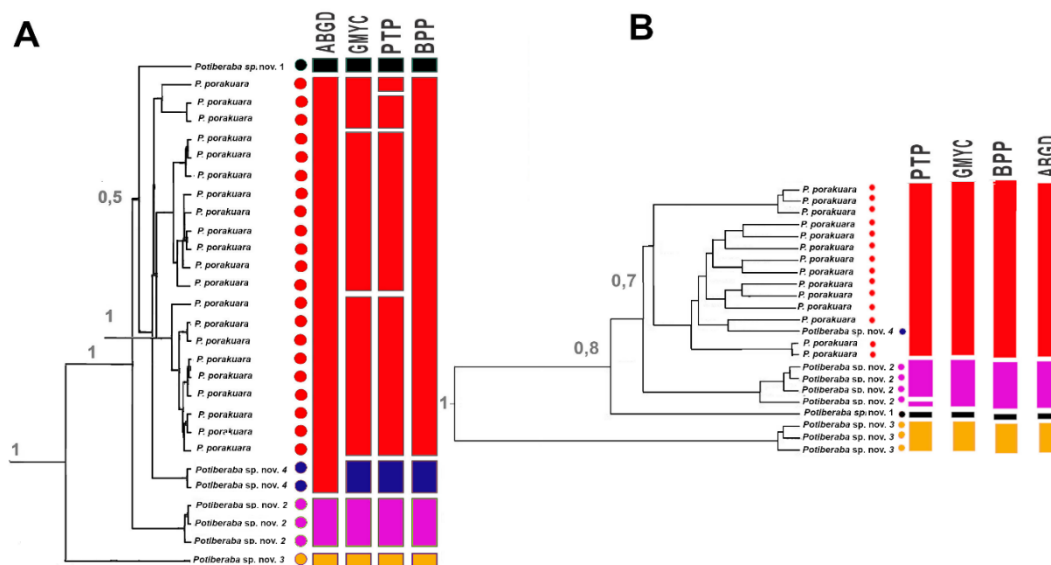


Figura 5. **A-** Árvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTP e BPP) para as linhagens do gênero *Potiberaba* utilizando o marcador mitocondrial *cox 1*, os círculos coloridos representam as diferentes linhagens, os valores próximos aos ramos indicam o suporte obtido para cada um deles. **B-** Arvore com inferência Bayesiana e testes de delimitação de linhagens (ABGD, GMYC, PTP e BPP) para as linhagens de *Potiberaba* utilizando o marcador nuclear 28S, as cores representam as diferentes linhagens seguindo o mesmo padrão da árvore A.

Diversidade Haplótipica

Para ambos os genes analisados, *P. porakuara* apresenta maior diversidade haplotípica em relação as outras linhagens, contendo 17 haplótipos de *cox1*, compartilhados entre as localidades, *Potiberaba* sp. nov. 1 contendo um haplótipo, *Potiberaba* sp. nov. 2 três, *Potiberaba* sp. nov. 3 um e *Potiberaba* sp. nov. 4 dois (Tabela 2). Excedo para *P. porakuara*, as possíveis novas espécies apresentam haplótipos únicos, sem compartilhamento com outras localidades, como encontrado em *P. porakuara*. O 28S se mostrou menos diverso para todas as linhagens, com 14 haplótipos distribuídos entre as cinco. Similar ao observado para *cox1*, existem haplótipos exclusivos em cada uma das novas linhagens, e compartilhamento entre as localidades de *P. porakuara*. Associado a isso, as possíveis novas linhagens apresentam entre si e *P. porakuara* grande número de passos mutacionais para o gene *cox1*, também encontrado para o 28S, ainda que em menor grau (Figura 6A e B).

Localidade	Nome	Lat/Long	Espécie	HapCoxI	Hap28S	Voucher
1	Furna Feia	05° 02' 11" 37° 33' 36"	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 1	1	1	GEEFAA-1386
2	Pedra Lisa	05° 02' 43" 37° 31' 18"	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 2	2, 3, 4	2, 3, 4, 5	GEEFAA-1387
3	Olho d'água da Onça	05° 28' 35" 37° 16' 50"	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 3	5	6, 7, 8	GEEFAA-1388
4	Crotes	05° 33' 38" 37° 39' 31"	<i>Potiberaba</i> sp. nov. 4	6, 7	9	GEEFAA-1394
5	Poço Feio	05° 29' 15" 37° 33' 33"	<i>Potiberaba porakuara</i>	8, 9, 10, 11, 12	10	GEEFAA-1390
6	Caverna da Água	05° 29' 43" 37° 32' 43"	<i>Potiberaba porakuara</i>	13,14	11	GEEFAA-1391
7	Olho d'água da Furna	05° 28' 50" 37° 32' 29"	<i>Potiberaba porakuara</i>	9, 10,15,16	12	GEEFAA-1392
8	Caverna Troglóbios	05° 33' 24" 37° 39' 40"	<i>Potiberaba porakuara</i>	16, 17	13	GEEFAA-1393
9	Olho D'água do Tetéu	05° 34' 02" 37° 40' 13"	<i>Potiberaba porakuara</i>	18, 19, 20	12	GEEFAA-1394
10	Caverna boa	05° 33' 59" 37° 41' 52"	<i>Potiberaba porakuara</i>	20	14	GEEFAA-1395
11	Gruta Três Lagos	05° 35' 34" 37° 41' 12"	<i>Potiberaba porakuara</i>	19, 21, 22, 23	14	GEEFAA-1396
12	Olho d'água do Cedro	05° 12' 01" 37° 46' 34"	<i>Potiberaba porakuara</i>	8, 24	-	GEEFAA-1397

Tabela 2- Locais de amostragem de *Potiberaba* e distribuição haplotípica (Hap) para o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (*coxI*), e para o gene nuclear 28S. Os números em HapCOXI e Hap28S, representam os haplótipos encontrados para cada gene em cada linhagem.

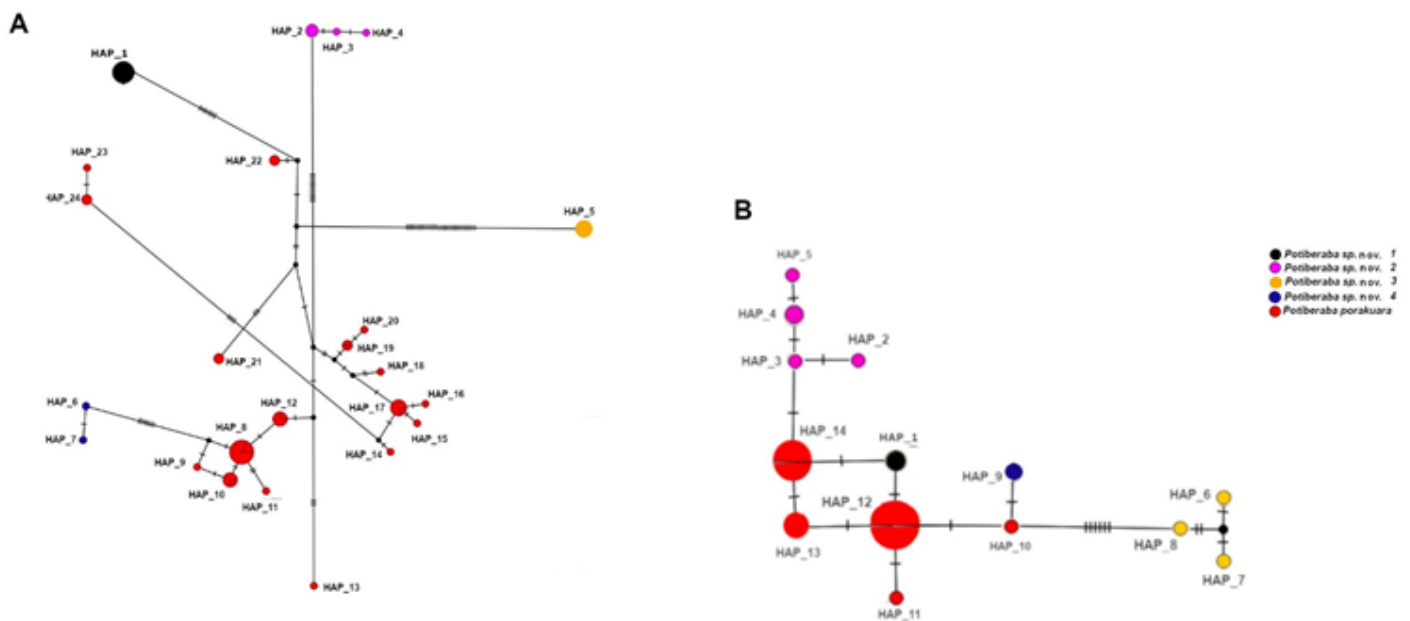


Figura 6. A – Rede de haplótipo para o gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (*coxI*), B – rede de haplótipos para o gene nuclear 28S. Ambos os conjuntos de dados são de localidade de *Potiberaba* sp. nov. 1, 2, 3 e 4, além de *Potiberaba porakuara*. Em preto *Potiberaba* sp. nov. 1, em rosa *Potiberaba* sp. nov. 2, amarelo *Potiberaba* sp. nov. 3, em azul *Potiberaba* sp. nov. 4, e em vermelho *Potiberaba porakuara*.

Análises morfológicas

Os resultados obtidos através da PCA revelam tendências de separação morfológica entre as cinco linhagens, com pouco distanciamento dos pontos diante de seus centros de dispersão, assim como o baixo grau de deformação da elipse e a não interseção delas, indicando baixa variação intraespecífica em detrimento da variação interespecífica. A porcentagem de explicação da variação obtida através da soma dos dois eixos da PCA, explica 95.5% da variação observada, entretanto, há discrepância quanto aos valores de explicação de cada eixo (Figura 7A).

As partições entre *Potiberaba* sp. nov. 1, 2 e 3, observadas no eixo Y, podem levar ao entendimento de grande divergência entre as linhagens, entretanto, o eixo corresponde a apenas 17,4% da variação. Tomando como pressuposto o baixo valor de explicação do eixo, a variação entre essas linhagens pode ser menor do que aparenta. Por outro lado, as partições ocasionadas pelo eixo X, que corresponde a 75,3% de explicação da variação, podem refletir de forma mais fidedigna a variação fenotípica. Observando as divisões, três das quatro novas linhagem foram agrupadas opostas a *Potiberaba porakuara*, indicando diferenças mais acentuadas entre essas linhagens e *P. porakuara*. Apenas *Potiberaba* sp. nov. 4 não seguiu o mesmo padrão de partição, sendo essa, linhagem com ocorrência mais próxima do conjunto de cavernas que abrigam *P. porakuara* (Figura 7A), mas ainda assim, mostrando haver diferença frente *P. porakuara* e as outras linhagens. Ainda na PCA, os *loads* de importância das variáveis morfológicas indicam que estruturas como os urópodes (UII e UIII), de modo geral, tiveram os maiores pesos na separação de grupos em ambos os eixos.

O padrão de dispersão e partição observado no gráfico da CVA, através dos eixo Y(53,2% da variação) e Y (42,5% da variação) indica, assim como na PCA, que as cinco linhagens apresentam divergência quanto aos caracteres analisados, em maior grau, em estruturas como antenas e urópodes, e em menor graus em estruturas como gnatópodos, gerando agrupamentos entre indivíduos co-específicos, com pouco distanciamento do centro de dispersão e baixo grau de deformação das elipses para as quatro novas linhagens, indicando baixa variação intraespecífica e maior diferenciação entre os grupos. Entretanto, a análise indicou maior ocorrência de variação intraespecífica em *P. porakuara*, com pontos dispersos em relação ao seu centro de dispersão, e grande deslocamento da elipse (Figura 7B). Os valores de significância intra e interespecífica reforçam a distinção morfológica entre as linhagens, com valores significativos entre os cinco grupos ($p < 0.05$), e baixos valores de significância nas comparações ($p > 0.05$) intraespecíficas (Tabela 3).

Através das informações obtidas por meio das análises e inferências moleculares, delimitações de linhagens, populações, e inferências morfológicas, o estudo se propôs a descrever quatro novas linhagens de *Potiberaba*, considerando *Potiberaba* sp. nov. 4 como uma nova linhagem, uma vez que, apesar de não ser designada como um grupo distinto de *P. porakuara* para o marcador nuclear, as outras informações moleculares, assim como as evidências morfológicas fornecem subsídios para que *Potiberaba* sp. nov. 4 seja descrita como uma nova espécie.

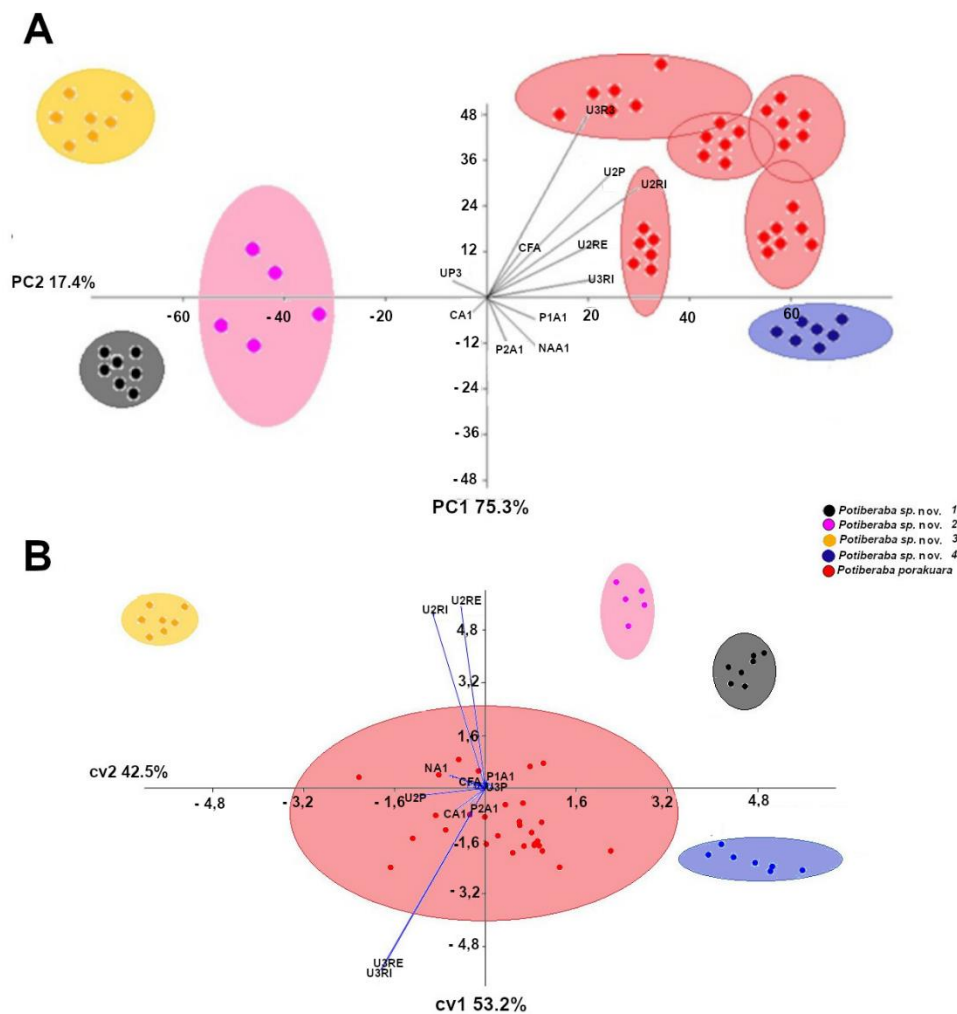


Figura 7. A- Análise de Componentes Principais (PCA) com as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas: : UP3 = Pedúnculo do urópodo III, CFA = Comprimento do flagelo acessório, CA1 = Comprimento da antena I, NAA1 = Número de artículos da antena I, P1A1 = Comprimento do pedúnculo I da antena I, P2A1 = Comprimento do pedúnculo II da antena I, P3A1 = Comprimento do

pedúnculo III da antena I, U3RE = Comprimento do ramo externo do urópodo III, U3RI = Comprimento do ramo interno do urópodo III, U2RE = Comprimento do ramo externo do urópodo II, U2RI = Comprimento do ramo interno do urópodo II, U2P = Comprimento do pedúnculo do urópodo. **B-** Análise de Variação Canônica (CVA), entre as cinco linhagens de *Potiberaba* utilizando as variáveis morfológicas aplicadas na PCA.

Tabela 3- Valores de significância obtidos através da CVA (Análise de variação canônica) em comparações intra e interespecíficas para o conjunto de dados morfológicos de *Potiberaba*. Valores inferiores a 0.05 foram considerados significativos na análise.

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

Descrição das novas espécies do gênero *Potiberaba*

Ordem: Anfípoda

Família: Mesogammaridae

Gênero: *Potiberaba*

***Potiberaba* sp. nov. 1**

Holótipo: Fêmea ovígera, 2.5mm (tamanho corporal), capturada na caverna Furna Feia, em 20/VI/ 2019. Coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Rodrigo Lopes Ferreira (Ferreira, L. F) e Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L) e Lindsey Hellmann (Hellmann, L). Fixada em lâmina. Voucher: GEEFAA 1386.

Parátipos: Dez fêmeas ovígeras, capturadas na caverna Furna Feia, na mesma data e pelos mesmos coletores dos holótipos. Voucher: GEEFAA 1391. Quatro Fêmeas ovígeras coletadas em 16/XII/2020, coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L), Valéria Fonseca Vale (Vale, V. F). Voucher: GEEFAA 1398. 15 fêmeas ovígeras coletadas em 03/VI/2021, coletor: Matheus Arthur Lúcio da Rocha (Rocha, M. A. L). Voucher: 1399.

Diagnose: Mandíbula esquerda com 6 dentículos, dátilo do gnatópode II reduzido e pedúnculo do urópode III maior que o do urópode I.

Localidade tipo: A Gruta da Furna Feia, localizada no município de Baraúna (Rio Grande do Norte), inserida no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF) (05° 02' 11" 37° 33' 36"). A caverna tem uma grande entrada vertical que dá acesso a espaçosos corredores na porção inicial da caverna, afunilando em regiões mais profundas. Na parte medial e final, há poças formadas por gotejamento, bem como poças formadas por afloramento de água que abrigam invertebrados como, anfípodas, isópodes e planárias. Detritos orgânicos entram na caverna através de morcegos (principalmente morcegos insetívoros (*Lonchorhina aurita* e *Desmodus rotundus*), formando depósitos de guano que são usados como fonte de alimento pela fauna local. Nos locais onde realizamos a amostragem, encontramos uma grande quantidade de anfípodas associados ao substrato formado por cascalho e lama, bem como associados ao material vegetal

em decomposição. A maioria dos indivíduos foi coletado diretamente do substrato, no entanto, alguns foram removidos dos fragmentos vegetais em decomposição.

Descrição da fêmea (machos não foram encontrados).

Corpo. Incolor; sem olhos. Aproximadamente 2.5 mm de comprimento. Lóbulo da cabeça mal desenvolvido; sinus da antena raso. Telson completamente fissionado; lóbulos retangulares e largos, região apical com duas cerdas.

Antena I-II - Antenas I-II Longas; tanto quanto o corpo ou mais. Segmentos pedunculares nas proporções 1: 0,90: 0,47; artículos pedunculares com seis cerdas faciais cada; cinco distais no artículo I, três no artículo II e uma no III. Flagelo acessório uniarticulado, mais longo que o primeiro articulo flagelar, duas cerdas subapicais. 22 artículos no Flagelo principal; aproximadamente o dobro do tamanho do pedúnculo. Calceolis ausentes. Comprimentos das antenas I e II nas proporções 1: 0,43. Antena II Segmentos pedunculares quatro e cinco de comprimento aproximadamente iguais; ambos com quatro cerdas. Flagelo com 11 artículos.

Partes da boca - Seis dentes no incisor da mandíbula direita, lacinia com seis dentes e uma cerda. Molar bem desenvolvido, triturativo. Seis dentes no incisor da mandíbula esquerda. Placas de dentículos na lacinia, processo molar bem desenvolvido, triturativo. Segmentos do palpo nas proporções 1: 2,5: 1,9; segmento proximal com quatro cerdas distais, segmento médio com três cerdas simples, várias cerdas no segmento distal. Maxila esquerda e direita semelhantes entre si; placa interna aproximadamente triangular, com pequenas cerdas; placa externa larga, com oito espinhos; palpo maxilar biarticulado, artículo distal com três cerdas espiniformes, uma cerda simples. Maxila II bilobada, lóbulo interno mais curto que o externo; coberto por cerdas na região facial, uma cerda curvada na região apical; lóbulo externo com várias cerdas. Maxilípede com lóbulo interno bem desenvolvido e largo; com quatro cerdas espiniformes apicais, várias cerdas simples, lóbulo externo com sete cerdas espiniformes, várias cerdas simples. Palpo articulado na razão 1:1,8:1,2:0,89, artículo proximal com uma cerda; segundo artículo com várias cerdas pequenas.

Placas coxais I-IV. Placas coxais I-IV com larguras (comprimento anteroposterior) de 0,62, 0,55, 0,79, 0,95. Placas coxais I-II sub-quadradas; placas III-IV irregulares e côncavas. Ao longo das margens antero-distais de uma a quatro cerdas, na I coxa três cerdas faciais. Brânquias

II-V ovoides, ligeiramente maiores até brânquia IV que se estende além da base, brânquia V curta. Placas coxais V-VII sem lóbulos distintos, V com quatro cerdas ao longo da margem anterior, VI com uma cerda anterior; uma postero-ventral; VII com cerda única.

Gnatópodes I-II. Base I alongada, duas cerdas marginais anteriores; três posteriores; ísquio com cerda postero-facial; cinco cerdas posteriores no mero; carpo ligeiramente triangular, uma cerda facial, seis cerdas plumosas antero-marginais; própodo subretangular, margens anteriores e posteriores sub-ovais, largura : comprimento 1: 2,08; palma ligeiramente oblíqua, seis cerdas antero-marginais, três postero-marginais, quatro faciais. Canto palmar com duas cerdas espiniformes. Dáctilo bem desenvolvido; um pouco mais longo que uma palma. Base II mais alongada do que a base I, uma cerda posterior e uma anterior; ísquio com uma cerda postero-distal; mero com quatro cerdas postero-distais; carpo alongado, duas cerdas anteriores, quatro fileiras oblíquas de cerdas posteriores. Própodo estreito, afunilando distalmente, margem anterior convexa, margem posterior reta, três cerdas antero-marginais, dáctilo reduzido.

Pereópodes III-IV. Igualmente longos, com cerdas espaçadas ao longo de todos os artículos, presentes ao longo das margens anteriores e posteriores; dáctilo bem definido; duas pequenas cerdas dorsais; duas espiniformes ventrais.

Pereópodes V-VII. Pereópodes V: VI: VII nas proporções 1:1,8:1,8. Bases ovoide, margens anteriores e posteriores ligeiramente convexas. Base V com quatro cerdas posteriores e duas anteriores; base VI com quatro cerdas posteriores e quatro anteriores; base VII com quatro cerdas anteriores e quatro posteriores.

Urópodes. Urópode I pedúnculo: ramo interior: ramo externo 1: 0,77: 0,86; pedúnculo com quatro cerdas espiniformes laterais, distalmente dilatado, ramo interno: ramo externo nas proporções 1:0,88, ramo externo com sete cerdas espiniformes dorsais, quatro apicais; ramo interno com três cerdas dorsais, três apicais, Ramos do urópodo II pontiagudos, não excedendo o urópodo I. Urópodo III alongado, pedúnculo com três cerdas espiniformes, duas cerdas plumosas. Ramo interno com quatro grupos laterais mistos de cerdas plumosas e espiniformes, quatro cerdas espiniformes apicais. Ramo externo com quatro grupos laterais de cerdas espiniformes. Ramo interno: ramo externo nas proporções 1:0,94.

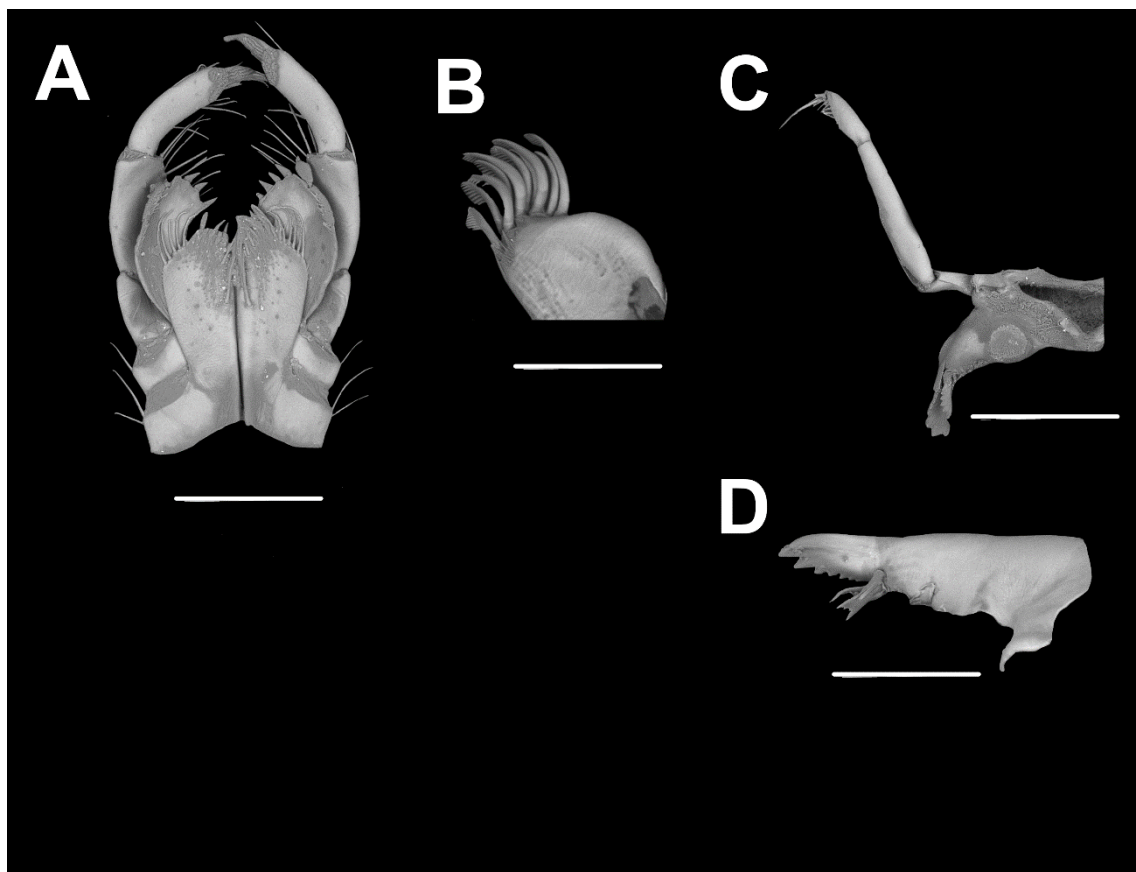


Figura 8- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 1. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C** e **D-** Mandíbula.

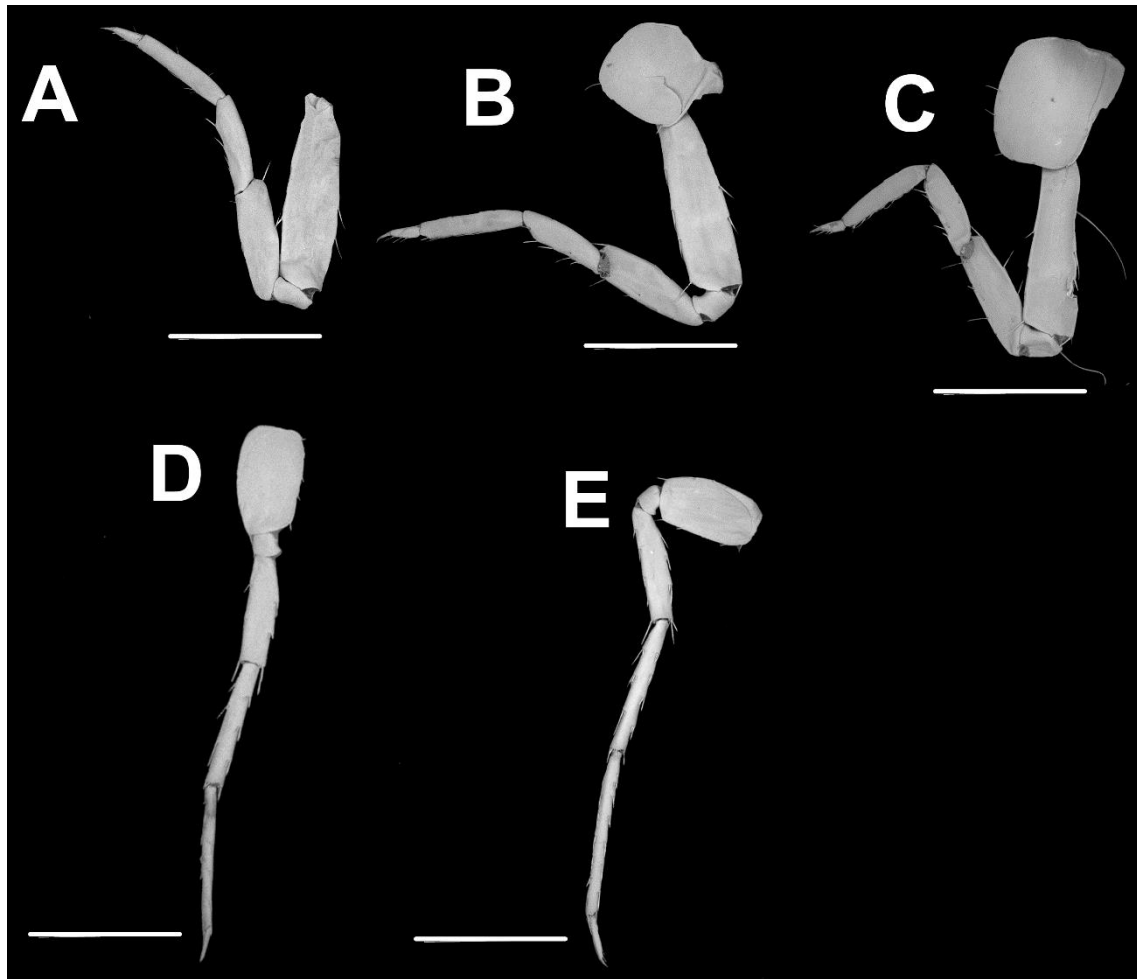


Figura 9- Pereópodes I – V de *Potiberaba* sp. 1.

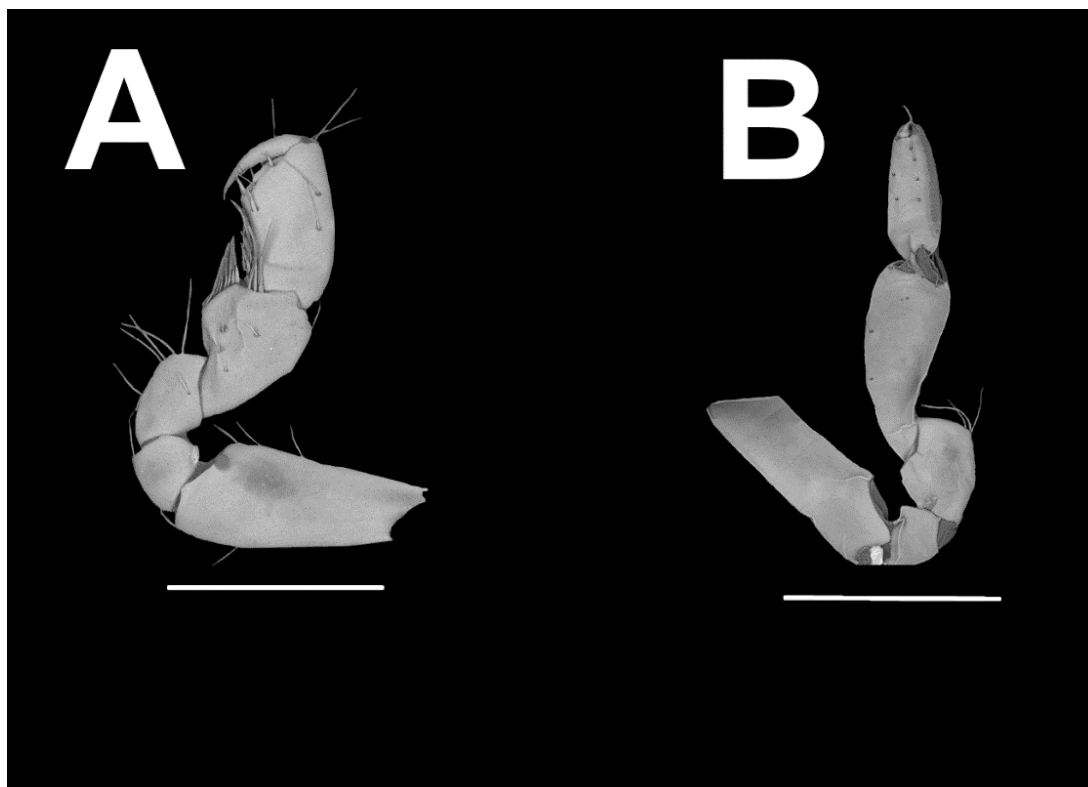


Figura 10- Gnatópodes I e II e *Potiberaba* sp. 1. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

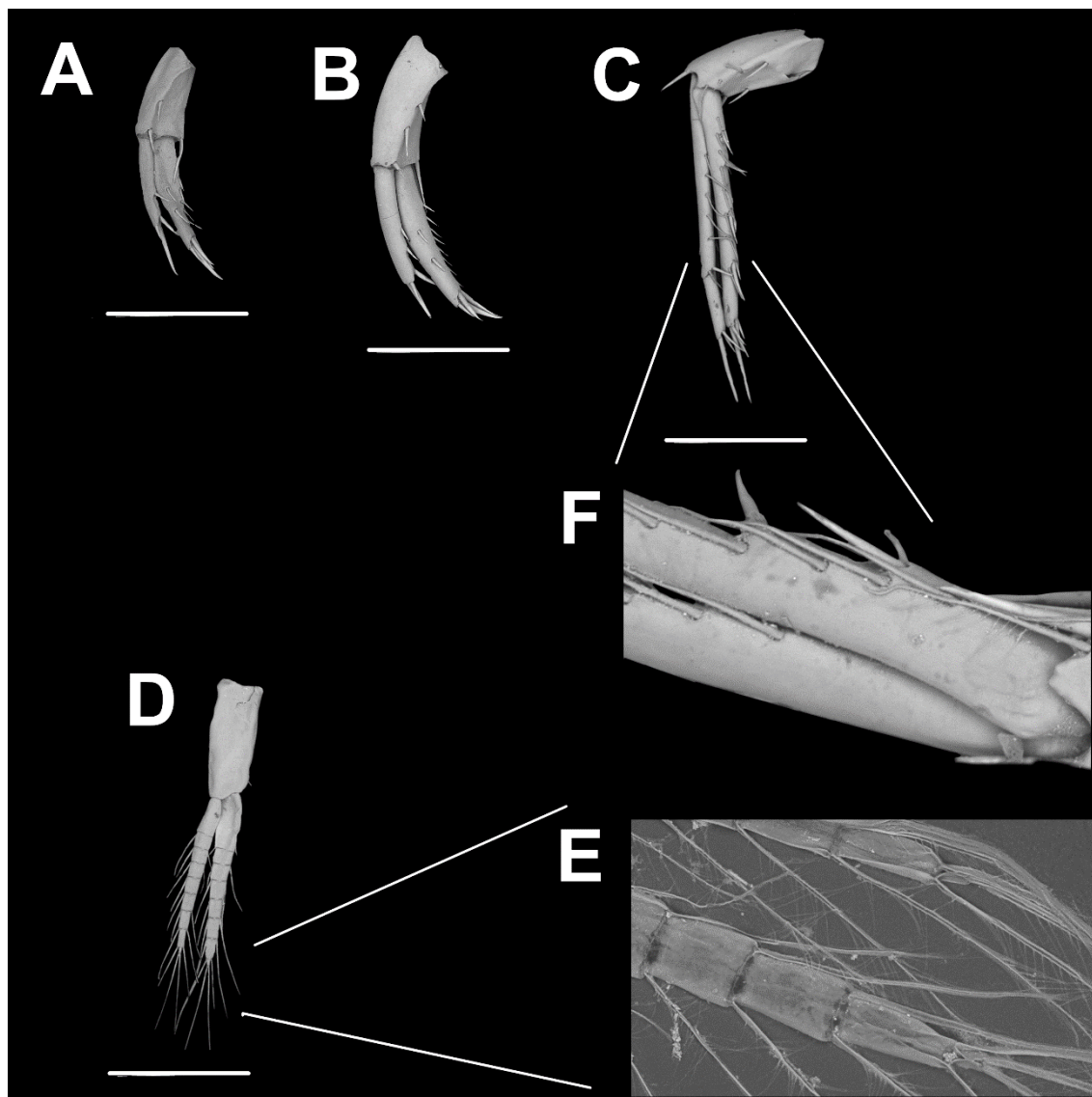


Figura 11- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 1. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Potiberaba* sp. nov. 2*Ordem:** Anfípoda**Família:** Mesogammaridae**Gênero:** *Potiberaba*

Holótipo: Fêmea intacta, 6.0 mm de comprimento, capturada na caverna Pedra Lisa, 20/VI/2019. Coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Rodrigo Lopes Ferreira (Ferreira, L. F), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L) e Lindsey Hellmann (Hellmann, L). Fixada em lâmina. Voucher: GEEFAA 1387.

Parátipos: Cinco fêmeas ovígeras, capturadas na caverna Pedra Lisa, na mesma data e pelos mesmos coletores dos holótipos. Voucher: GEEFAA 1392. Seis Fêmeas ovígeras coletadas em 16/XII/2020, coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L), Valéria Fonseca Vale (Vale, V. F). Voucher: GEEFAA 1400. Duas fêmeas ovígeras coletadas em 03/VI/2021, coletor: Matheus Arthur Lúcio da Rocha (Rocha, M. A. L). Voucher: 1341.

Diagnose: Mandíbula esquerda com oito denticulos, dactilo reduzido do gnatópode II com uma cerda apical, e pedúnculo do urópode III enquanto o pedúnculo do urópode I.

Localidade tipo: Endêmica da caverna Pedra Lisa, localizada no município de Mossoró, inserida no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF) (05° 02' 43" 37° 31' 18"). O local está em uma área cercada por mata, com dois acessos as zonas de ocorrência dos animais. A cavidade apresenta grande variação quanto ao volume de água entre as estações, sendo inundada na estação chuvosa, conectando todas as regiões da cavidade, e secando parcialmente durante a estação seca. Os animais foram capturados num local de solo predominantemente lamoso, com a presença de raízes criando diversos micro habitats, além disso, espécies também já foram encontrados ocupando material vegetal em decomposição. Além de anfípodas do gênero *Potiberaba*, espécimes de do gênero de anfípodas *Seborgia*, isópodes e planárias troglóbias também são encontrados na localidade.

Descrição da fêmea (machos não foram registrado para a espécie).

Corpo. Incolor e sem olhos, aproximadamente 6,0 mm. Lóbulo da cabeça mal desenvolvido; sinus antenal raso. Pleonitas sem cerdas. Margens ventrais côncavas; margens posteriores ligeiramente sinuosas nas placas I-II e reta na placa III. Margens posteriores e ventrais de placas epimerais com cerda única. Urosomitos I-III livre, cada um com até cinco cerdas ao longo das margens dorsoposteriores. Telson com fissura até a base, cada lóbulo retangular e aproximadamente tão largo quanto o comprimento, apicalmente com duas cerdas.

Antenas I e II- Antena I - longa; tanto quanto corpo ou mais. Segmentos pedunculares nas proporções 1:1:0,60; três cerdas faciais em cada artículo peduncular. Flagelo acessório uniarticulado; um pouco mais longo do que o primeiro artículo flagelar. 31 artículos no Flagelo principal com 31 artículos; aproximadamente o dobro do tamanho do pedúnculo. Calceolis ausentes. Comprimentos da antena I e II na proporção 1:0,46. Antena II - Os segmentos pedunculares quatro e cinco de comprimento aproximadamente iguais, cinco cerdas faciais ambos os artículos. Flagelo com dez artículos; aproximadamente 1,1 vezes maior do que os artículos pedunculares quatro e cinco juntos.

Partes da boca- Oito dentes no incisor da mandíbula direita, molar bem desenvolvido; triturativo. Oito dentes no incisor da mandíbula esquerda; processo molar bem desenvolvido. Relação de comprimento dos segmentos do palpo 1:1,5:1,3. Maxila esquerda e direita semelhantes; placa interna aproximadamente triangular; placa externa ampla, com sete espinhos; maxilar biarticulado; com cinco cerdas. Maxila II bilobada; lóbulo interno mais curto do que o externo; cerdas plumosas em ambos; lóbulo interno bem desenvolvido; largo; com quatro cerdas médio-distais, quatro apicais, e várias cerdas na região facial; seis espinhos apicais no lóbulo externo; cinco cerdas mesio-submarginais e quatro cerdas marginais. Palpo articulado na razão 1:1,8:1,2:0,89, artículo sem cerda, três cerdas mesiais no dátilo. Lóbulo interno do labium mal desenvolvido.

Placas coxais I-IV medindo em largura: 0,63, 0. 57,0. 78 e 0. 91 (distâncias dorsoventrais). Placas coxais I-II sub quadradas, placas III-IV irregulares; margem ligeiramente côncava. De uma a seis cerdas nas margens anteriores, cerdas faciais na coxa. Brânquias II-V pedicelárias e ovóides. Placas coxais V-VII sem lóbulos distintos, quatro cerdas na margem anterior e uma cerda posteroventral na V. Uma cerda anterior nas VI e VII. Oostegitos em pereópodes II, III, IV e V.

Gnatópodes I-II. Base I alongada e lisa; ísquio liso; quatro cerdas simples no mero; carpo triangular, quatro cerdas irregulares na lateral da base; própodo similar ao gammaride, margens anteriores e posteriores subquadradas, proporção largura-comprimento 1: 1,8; palma ligeiramente oblíqua; seis cerdas submarginais e três anteroapicais na margem anterior, linha de quatro cerdas na margem posterior; sete espinhos na palma. Dáctilo bem desenvolvido; um pouco mais longo que a palma. Base II mais alongada do que a base I; com uma cerda anterior e uma posterior; ísquio com uma cerda facial, mero com uma cerda facial; quatro médias-posteriores; carpo alongado, 1/2 da base e aproximadamente duas vezes maior que o própodo II; com duas cerdas anterodistais, e duas linhas oblíquas de cerdas posteriores. Própedo estreito, afunilando distalmente, margem anterior convexa, margem posterior reta; com duas cerdas; margem anterior com quatro cerdas; margem posterior com seis cerdas submarginais; dáctilo reduzido.

Pereópodes III-IV. Igualmente longos com cerdas ao longo das margens anteriores e posteriores de todos os artículos, dáctilo bem definido.

Pereópodes V-VII. Pereópodes V: VI: VII com proporções 1:1,6:1,7. Bases ovoides; 12 cerdas nas margens anteriores e posteriores; convexas, seis cerdas nas margens anteriores. Todos os artículos entre ísquio e própodo com grupos de cerdas; própodos V-VII com quatro, oito, quatro conjuntos de cerdas. Dáctilo robusto; com cerdas; cada dáctilo com quatro, seis, quatro cerdas. Dáctilo do pereópodo VII com 0,13 de comprimento do própodo.

Urópodes- Urópode I ramo interno: ramo externo com proporções: 0,75:0,86; ramo interno arredondado; seis cerdas dorsais no ramo externo; quatro espinhos apicais; quatro cerdas no ramo interno. Urópode II; ramos pontiagudos e não excede o comprimento do urópodo I. Urópode III com ramos em forma de vara. Quatro grupos laterais de cerdas no ramo interno; cinco cerdas espiniformes apicais; quatro grupos laterais de cerdas espiniformes no ramo externo com; duas mesiais; cerdas no artículo distal; cinco espinhos apicais. Ramo externo: ramo interno como 1: 0,95, artículo distal com 0,34 do artigo proximal.

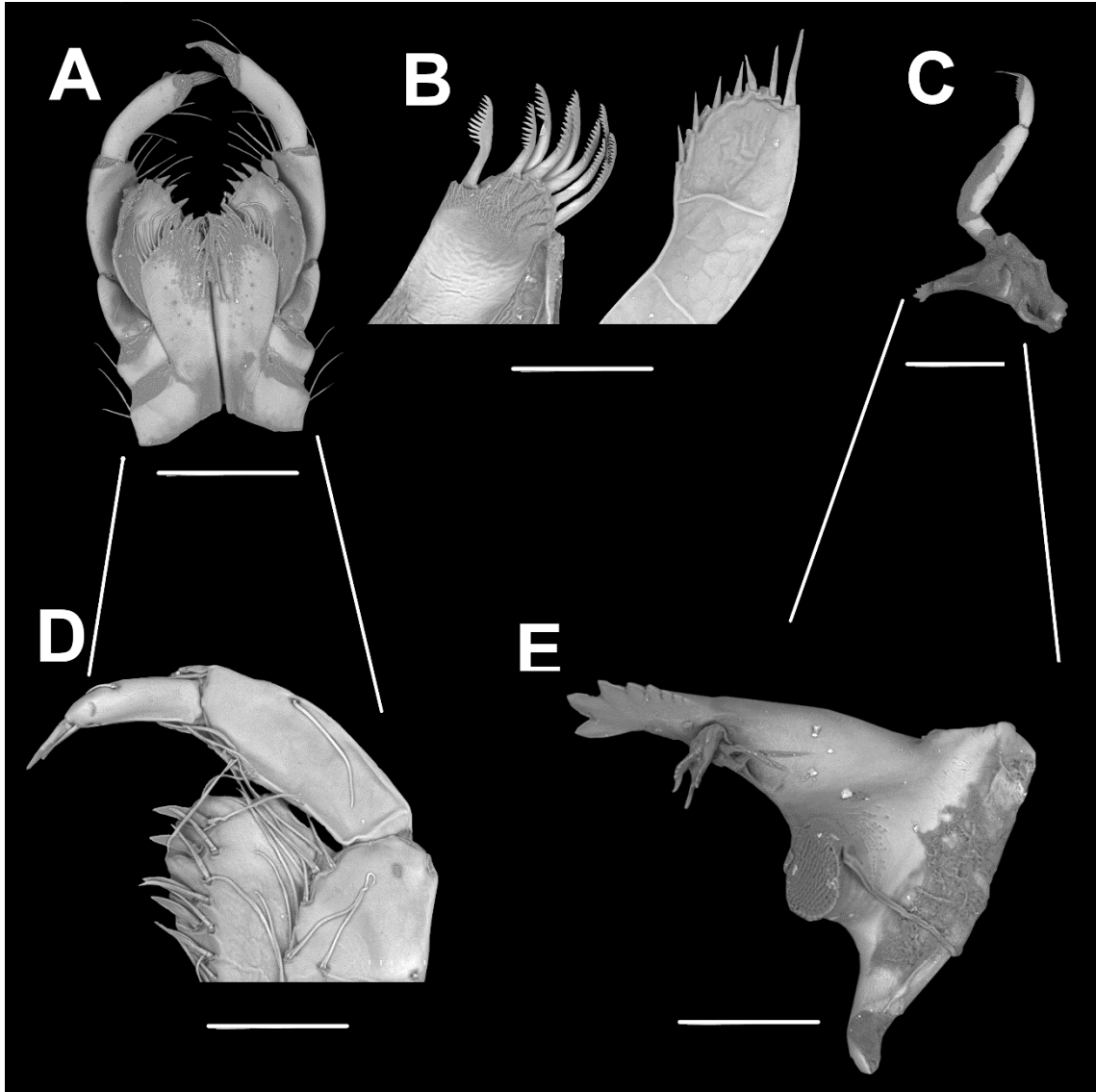


Figura 12- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 2. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C- E** mandíbula e molar.

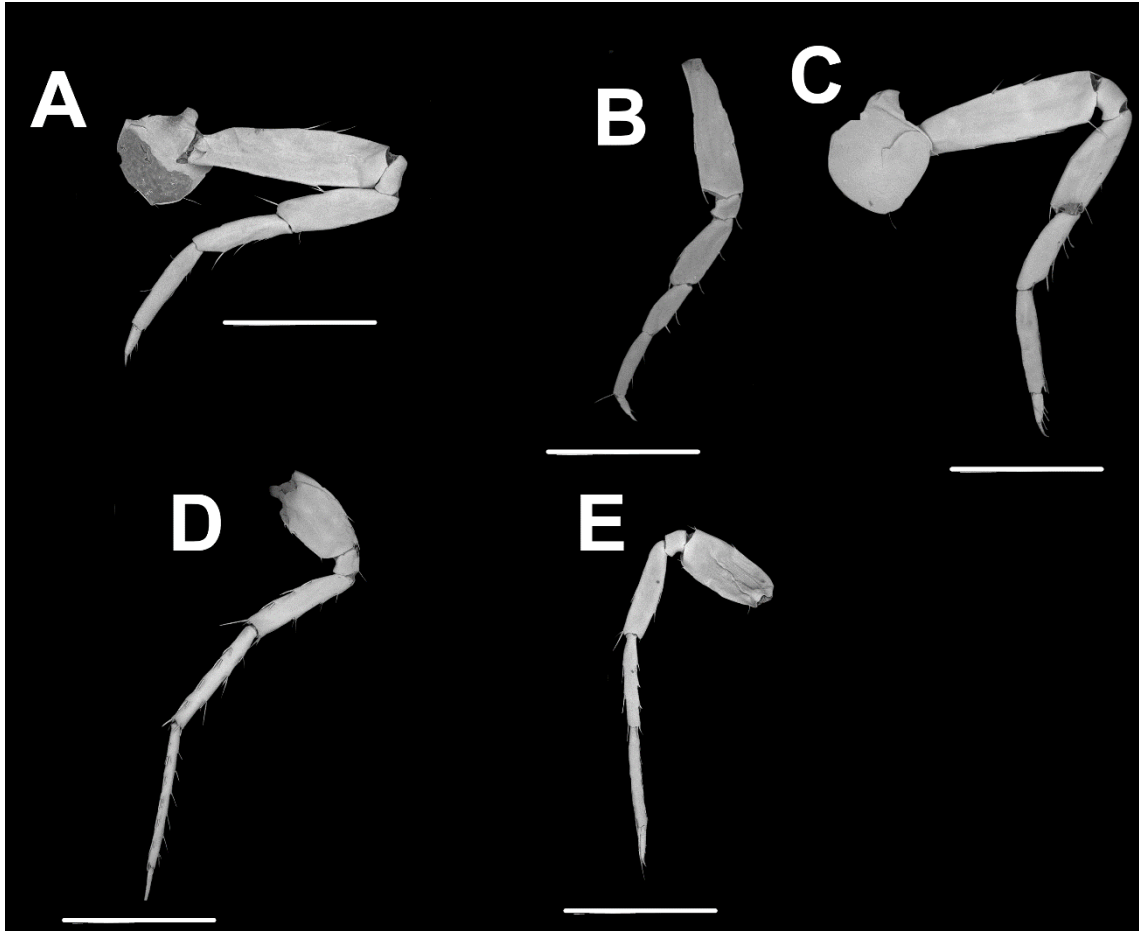


Figura 13- Pereópodes I – V de *Potibaraba* sp. 2.

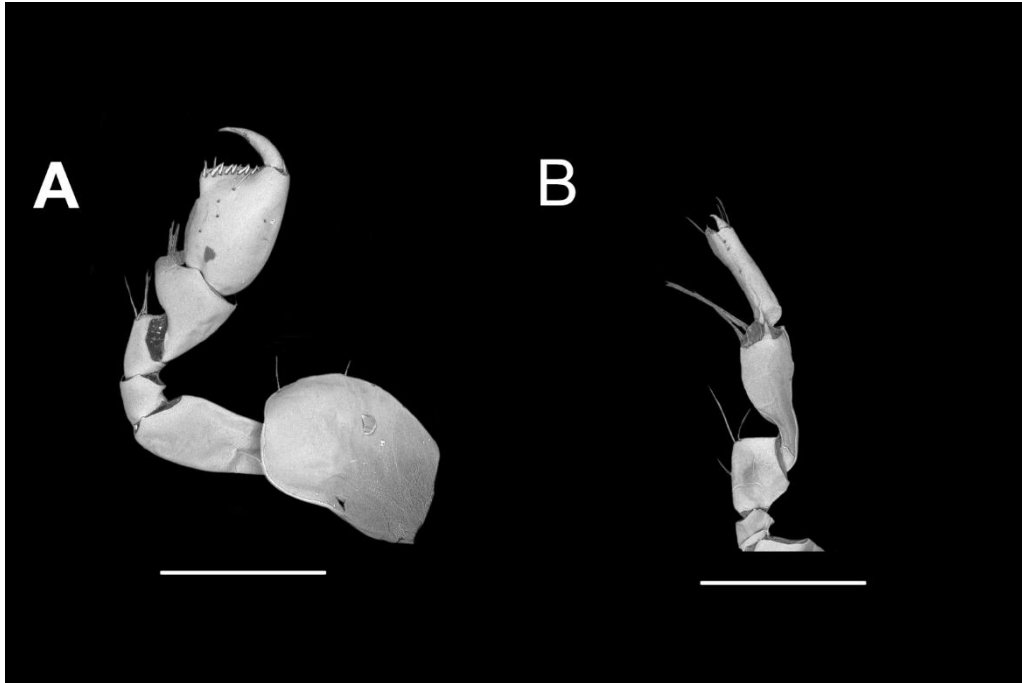


Figura 14- Gnatópodes I e II e *Potiberaba* sp. 2. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

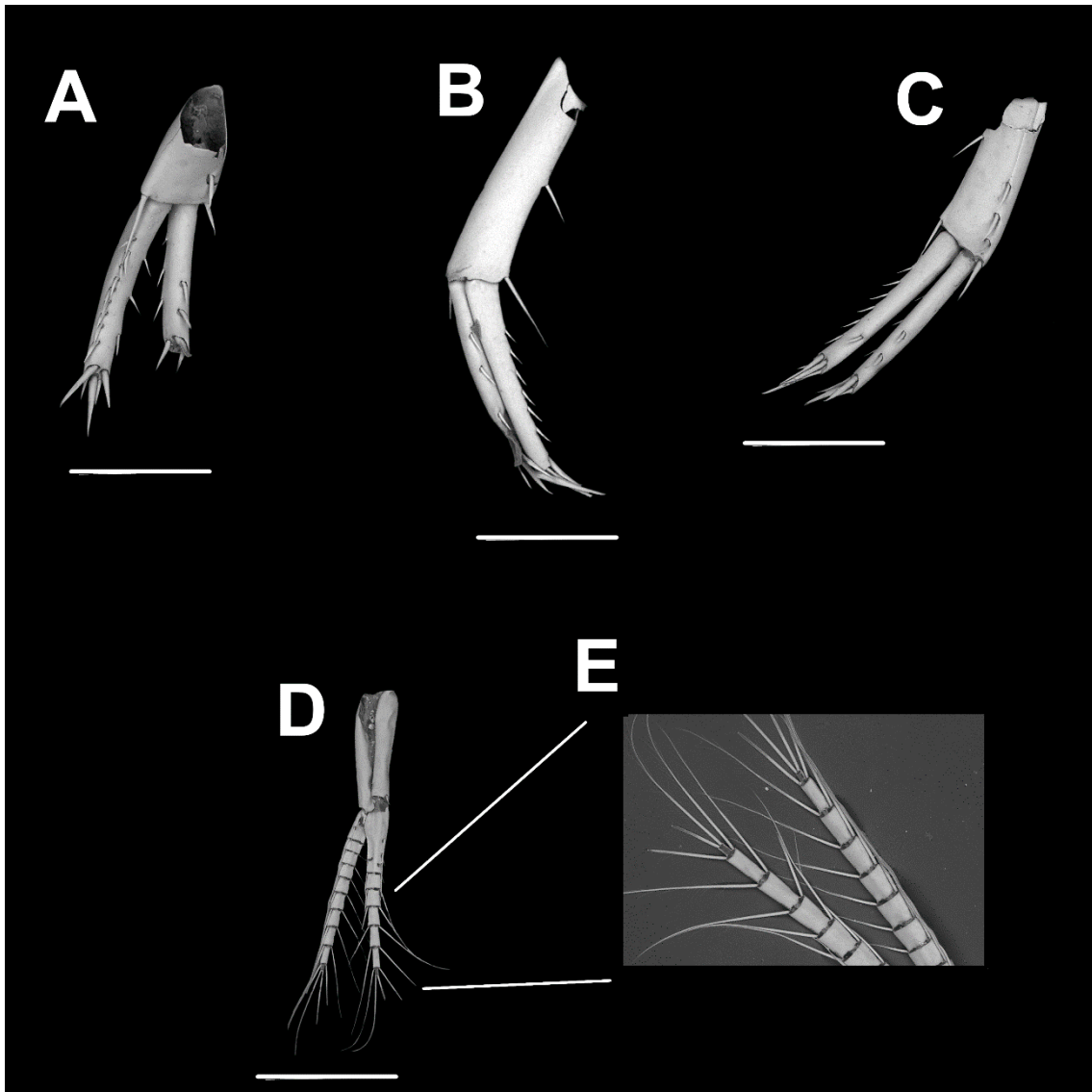


Figura 15- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 2. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Potiberaba* sp. nov. 3*Ordem:** Anfípoda**Família:** Mesogammaridae**Gênero:** *Potiberaba*

Holótipo: Fêmea intacta, 4.0mm de comprimento, capturada na localidade Olho d'água da onça, em 20/VI/2019. Coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Rodrigo Lopes Ferreira (Ferreira, L. F), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L) e Lindsey Hellmann (Hellmann, L). Fixada em lâmina. Voucher: GEEFAA 1388.

Parátipos: Sete fêmeas; quatro ovígeras, três juvenis, capturadas na localidade Olho d'água da Onça, na mesma data e pelos mesmos coletores dos holótipos. Voucher: GEEFAA 1393. Oito Fêmeas ovígeras coletadas em 16/XII/2020, coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A. L), Valéria Fonseca Vale (Vale, V. F). Voucher: GEEFAA 1341. Oito fêmeas ovígeras coletadas em 03/VI/2021, coletor: Matheus Arthur Lúcio da Rocha (Rocha, M. A. L). Voucher: 1342.

Diagnose: Mandíbula esquerda com oito dentículos, dáctilo do gnatópode II reduzido com duas cerdas na base, pedúnculo do urópode III maior que o do urópode I.

Localidade tipo: Endêmica da localidade Olho d'Água da Onça (05° 28' 35" 37° 16' 50"), a espécie é encontrada em pequenas poças formadas por afloramentos de água subterrânea, geralmente encontradas sob rochas calcárias. As poças apresentam solo predominantemente lamoso, com presença de cascalho e preenchidas com gramíneas aquáticas. Além de anfípodas, planárias troglóbias também já foram registradas no local. A localidade situa-se próxima de áreas utilizadas para retirada de água para agricultura e pesca. Em época chuvosa, as poças podem ser conectadas com um riacho próximo, proporcionando que predadores como peixes e macro crustáceos tenham acesso aos anfípodas.

Descrição da fêmea (Machos não foram encontrados na espécie)

Corpo. Incolor e sem olhos, aproximadamente 4,0 mm. Lóbulos da cabeça mal desenvolvido; sinus da antena raso. Pleonitas sem cerdas. Placas epimerais I-III pós-angulares; margens ventrais côncavas; margens posteriores sinuosas nas placas I-II e reta na placa III. Margens posteriores das placas epimerais com cerda única. Urosomitos I-III livres, cada um com até cinco cerdas. Telson fissionado até a base, cada lóbulos retangular e aproximadamente tão largo quanto o comprimento com duas cerdas apicais.

Antenas I- Longa; tanto quanto corpo ou mais. Segmentos pedunculares na proporção 1:0,97:0,49; cinco cerdas faciais nos artículos peduncular. Flagelo acessório uniarticulado; mais longo do que o primeiro artículo flagelar; quatro cerdas apicais em cada artículo flagelar. Flagelo principal com 30 artículos, aproximadamente o dobro do tamanho do pedúnculo. Calceolis ausentes. Comprimentos da antena I e II na razão 1:0,39. **Antena II** - os segmentos pedunculares quatro e cinco de comprimento aproximadamente iguais, ambos os artículos com até seis cerdas faciais e dez distais. Flagelo com 11 artículos, aproximadamente 1,09 vezes maior do que os artículos pedunculares quatro e cinco juntos.

Partes da boca- Sete dentes no incisor da mandíbula direita, molar desenvolvido; triturativo. Oito dentes no incisor da mandíbula esquerda; molar desenvolvido; triturativo. Relação de comprimento dos segmentos do palpo 1:2,6:1,4; segmento proximal sem cerda. Maxila esquerda e direita semelhantes; placa interna triangular; presença de inumeras cerdas; oito espinhos na placa externa; maxilar biarticulado. Maxila II bilobada, lóbulos internos mais curto do que externo; cerdas na região distal dos lóbulos extenos. Lóbulos internos bem desenvolvidos; várias cerdas minúsculas faciais; lóbulos externos com seis espinhos apicais, cinco cerdas submarginais; quatro cerdas latero-marginais. Palpo articulado; razão 1:2,3:1,7:0,78, artículo proximal-sem cerda; segundo artículo com cerda lateral; própodo com cerdas distais e laterais em grupos mal definidos, dáctilo com três cerdas. Labium com lóbulos interno mal desenvolvido.

Placas coxais I-IV com larguras 0,61, 0,71, 0,63 e 0,89. Placas coxais I-II sub quadradas, placas III-IV em forma irregular com margem côncava. Ao longo das margens antero-distais de uma a seis cerdas, na coxa poucas cerdas faciais. Brânquias II-V ovóides, progressivamente maiores até brânquia IV, brânquia V curta. Placas coxais V-VII sem lóbulos distintos, V com quatro

cerdas ao longo da margem anterior; VI com uma cerda anterior e uma posteroventral; VII com cerda única. Oostegitos em pereópodes II-VI.

Gnatópodes I-II. Base I alongada, duas cerdas marginais anteriores; três posteriores; uma cerda posterior no ísquio; seis cerdas espaçadas no mero; carpo aproximadamente triangular, com uma cerda distal; duas cerdas faciais, linha marginal com seis a onze cerdas; própodo de forma gammaroide; margens anteriores e posteriores sub-quadradas, largura : comprimento sendo de 1: 1,69; palma ligeiramente oblíqua; margem anterior com três cerdas submarginais; três anteromarginais, margem posterior com uma fileira de seis cerdas submarginais e duas faciais; canto palmar definido; com duas cerdas espiniformes. Dáctilo bem desenvolvido; um pouco mais longo que a palma, com cerda única. Base II mais alongada do que a base I, com duas cerdas anteriores e duas posteriores; ísquio com cerda facial, mero com uma cerda facial e uma cerda posterodistal; carpo alongado, 1/2 da base e duas vezes maior que o própodo II; três cerdas anteriores; Própodo estreito; afunilando distalmente; margem anterior convexa; margem posterior reta; margem anterior com cerdas submarginais; região medial com três cerdas, margem posterior com três cerdas submarginais; três faciais, dáctilo reduzido.

Pereópodes III-IV. Igualmente longos; com cerdas nas margens anteriores e posteriores de todos os artículos; dáctilo bem definido; duas cerdas dorsais; duas cerdas espiniformes ventrais.

Pereópodes V-VII. Pereópodes V: VI: VII com proporções 1:1,4:1,3. Bases ovóides; sem lóbulos distais; margens anteriores e posteriores ligeiramente convexas; com quatro, cerdas posteriores; margens anteriores com sete cerdas. Todos os artículos entre ísquio e própodo com grupos de cerdas espiniformes anteriores e posteriores; própodo V-VII com quatro cerdas. Dáctilo bem desenvolvido, com cerdas dorso-proximais e dorso-distais; cada dáctilo com três cerdas ventrais.

Urópodes- Urópodo I ramo interno: ramo exterior com proporções 0,75: 0,89. Urópodo I com ramo distal alongado e arredondado; ramo externo aproximadamente 0,86 maior que o ramo interno; ramo externo com dez cerdas dorsais; quatro espinhos apicais; ramo interno com três cerdas espiniformes dorsais. Urópodo II com ramo pontiagudo e não excede o comprimento do urópodo I, contendo várias cerdas. Urópodo III com ramo em forma de vara. Ramo interno com cinco grupos laterais de cerdas espiniformes, artículo proximal do ramo externo com cinco grupos laterais de cerdas; artículo distal com cerdas bem desenvolvidas, e cinco espinhos apicais. Ramo externo: ramo interno com proporções 1: 0,94, artículo distal mede 0,32 do artículo proximal.

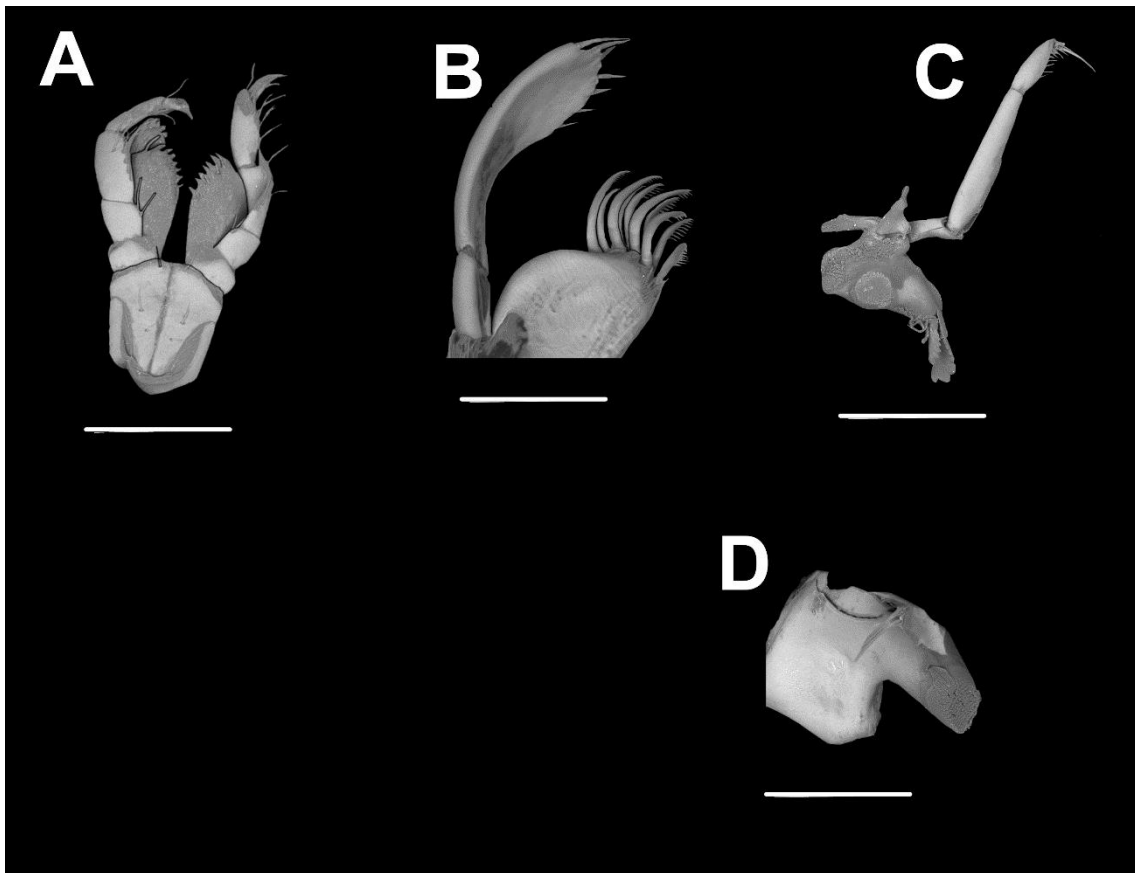


Figura 16- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 3. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C- D** mandíbula e molar.

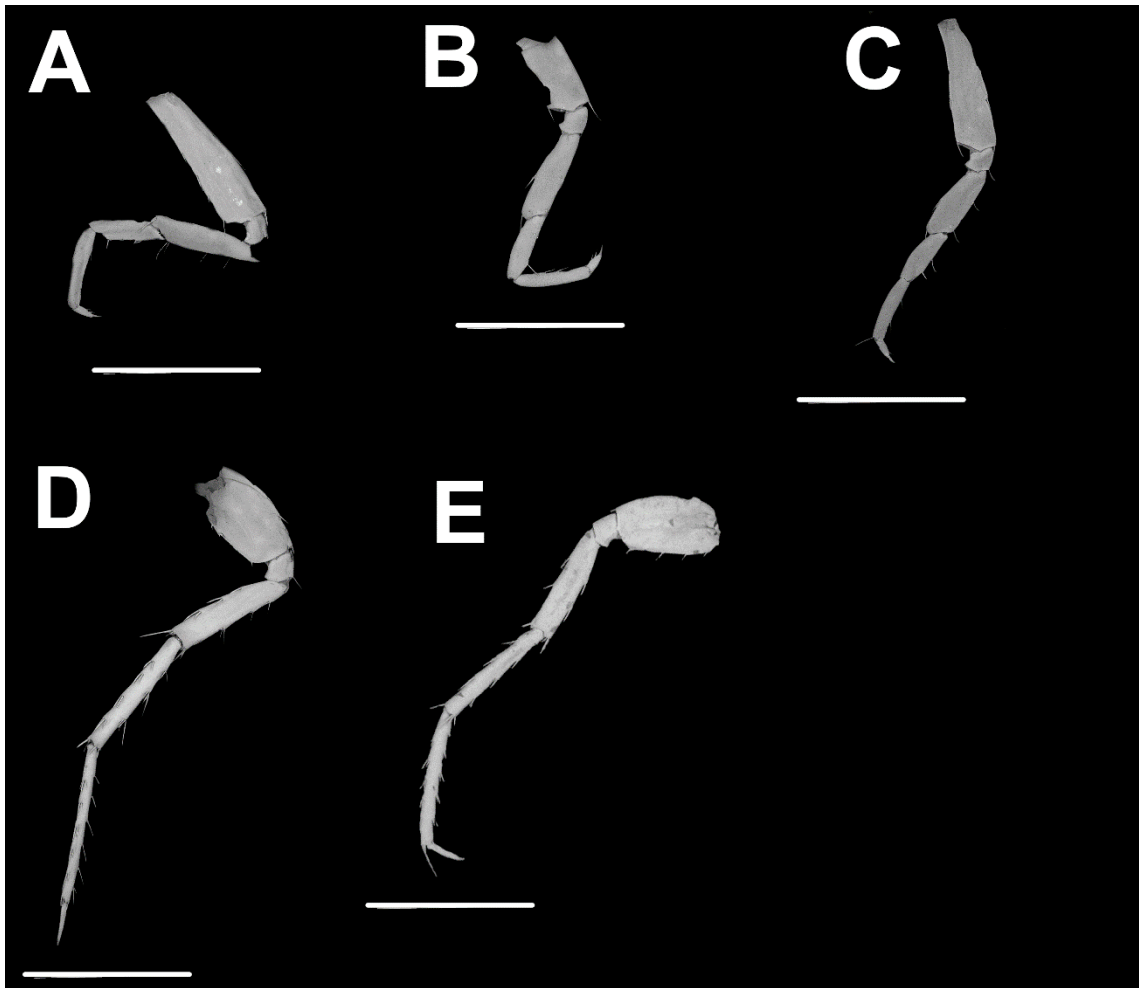


Figura 17- Pereópodos I – V de *Potibaraba* sp. 3.

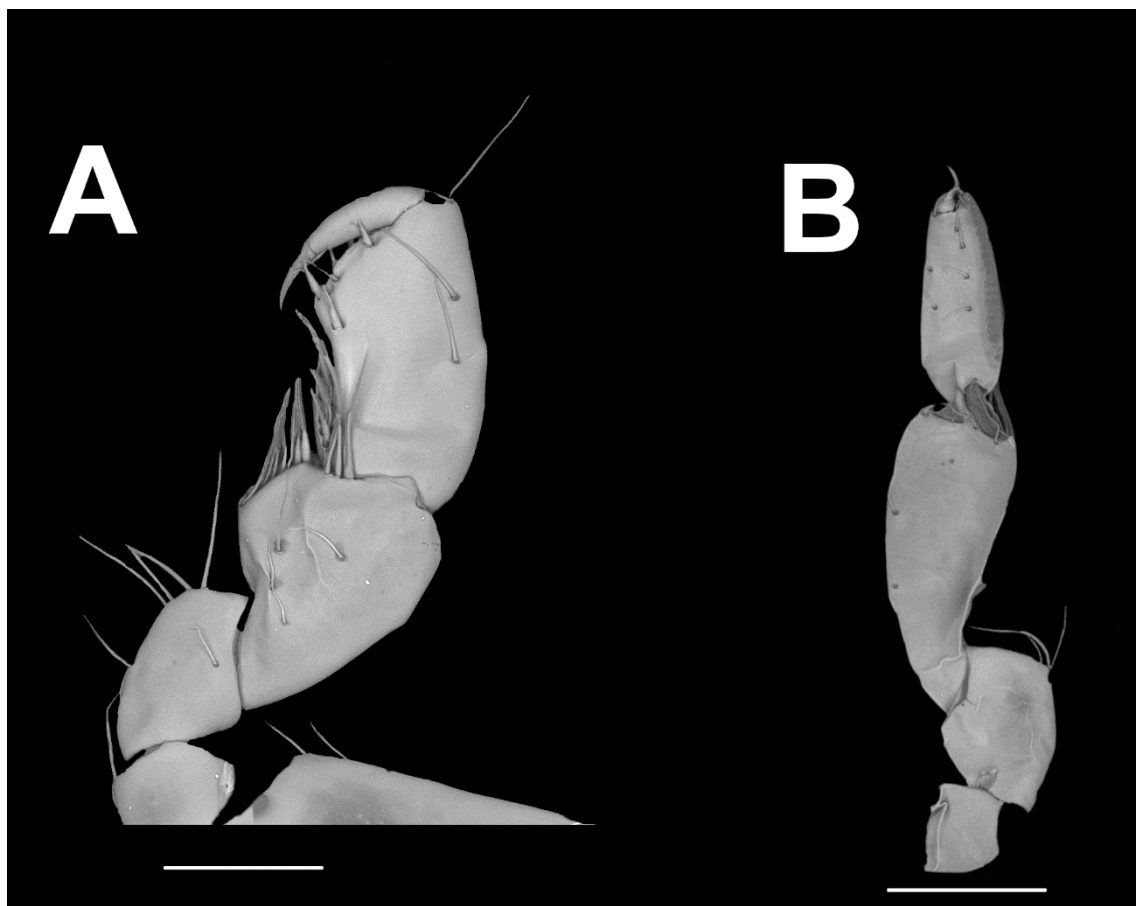


Figura 18- Gnatópodes I e II e *Potiberaba* sp. 3. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

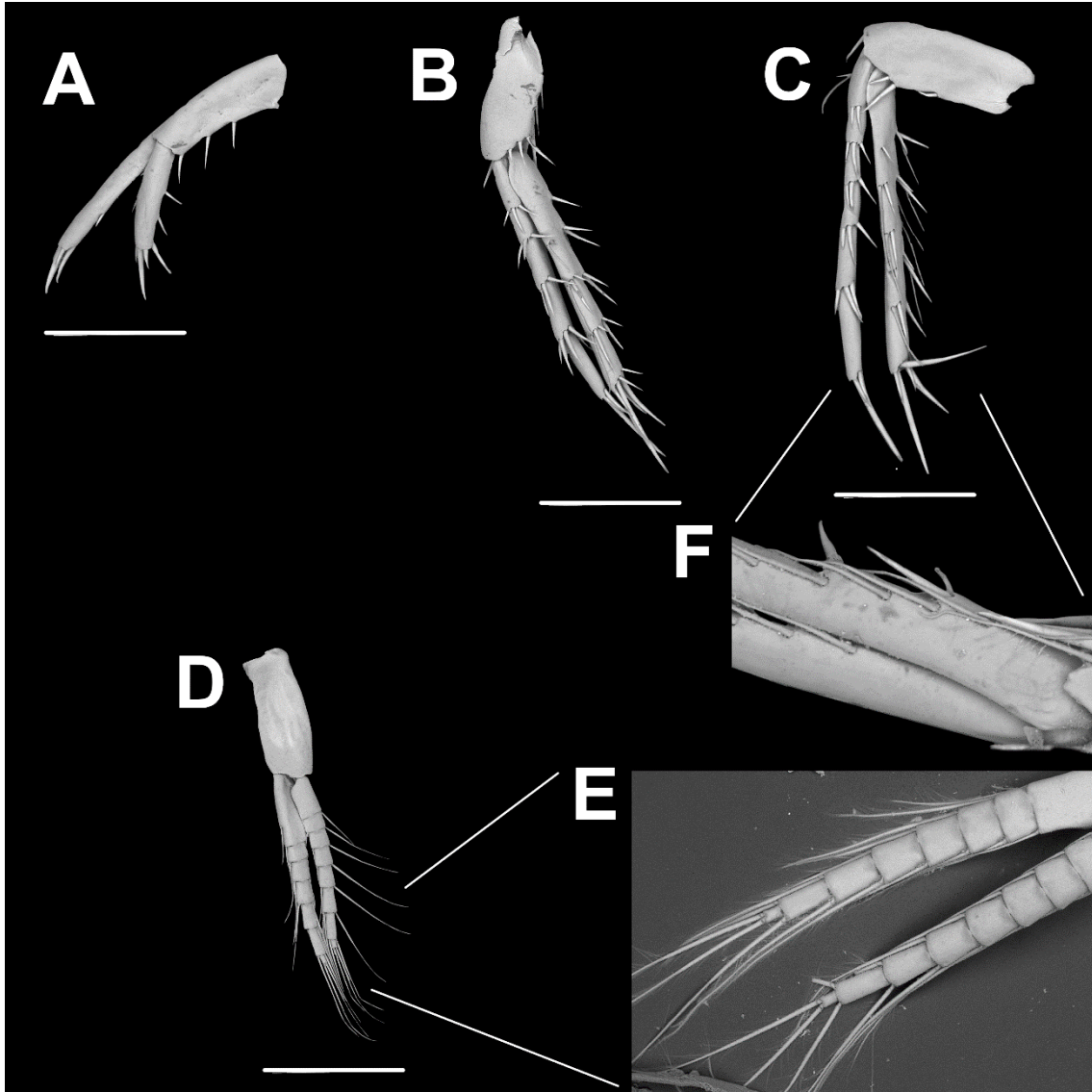


Figura 19- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 3. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Potiberaba* sp. nov. 4*Ordem:** Anfípoda**Família:** Mesogammaridae**Gênero:** *Potiberaba***Holótipo:** 1 fêmea, capturada na localidade Crotas, em 20/VI/2021. Coletores: Diego de Medeiros Bento (Bento, D. M), Matheus Arthur Lucio da Rocha (Rocha, M. A) e Carolina Puppim Golçalves (Gonçalves, C. P). Fixada em lâmina. Voucher: GEEFAA 1394.**Diagnose:** Mandíbula esquerda com oito dentículos, dátilo reduzido do gnatópode II com três cerdas na base, e pedúnculo do urópode III enquanto o pedúnculo do urópode I.**Localidade tipo:** Endêmica da caverna Crotas (05° 33' 38" 37° 39' 31"), a espécie ocorre em uma região próxima das localidades onde *P. porakuara* é registrado. Os animais são encontrados em um pequeno lago formado por água epicarstica, que escorre de uma região mais elevada e profunda da caverna, em uma região isolada sem conexão aparente com outros pontos dela. O local apresenta solo predominantemente pedregoso, com ausência de qualquer material vegetal ou guano, com pouca matéria orgânica disponível para fauna local. Além de anfípodas, planárias e isópodes troglóbios já foram registrados na localidade.**Descrição da fêmea (machos não foram encontrados na espécie)****Corpo.** Incolor; sem olhos, aproximadamente 5.6 mm. Lóbulo da cabeça mal desenvolvido; sinus alternal raso. Margem posterodorsal de cada pleonita sem cerda. Placas epimerais I-III pós-angulares; margens ventrais de retas; margens posteriores ligeiramente sinuosas nas placas I-II e reta na placa. Margens posteriores e ventrais de placas epimerais com cerda única. Urossomitos I-III livres, cada um com até quatro cerdas minúsculas ao longo das margens dorsoposteriores. Telson fissionado até a base, cada lóbulo retangular e aproximadamente tão largo quanto o comprimento.**Antena I-** longa, tanto quanto corpo ou mais. Segmentos pedunculares nas proporções 1:1:0,81; seis cerdas em cada artigo peduncular. Flagelo acessório uniarticulado, um pouco mais longo

do que o primeiro artigo flagelar, quatro cerdas subapicais. 32 artigos no flagelo principal, aproximadamente o dobro do tamanho do pedúnculo. Presença de calceolis. Comprimentos da antena I e II na proporção 1:0,48. **Antena II**- segmentos pedunculares quatro e cinco de comprimento aproximadamente iguais, ambos os artigos com até cinco cerdas faciais e até cinco distais. Flagelo com 12 artigos, aproximadamente 1,3 vezes mais do que os artigos pedunculares quatro e cinco juntos.

Partes da boca - Incisor da mandíbula direita com seis dentes, lacinia com seis dentes; triturativo. Incisor da mandíbula esquerda com oito dentes, lacinia com duas placas multidenticuladas; processo molar bem desenvolvido, triturativo. Relação de comprimento dos segmentos palpo 1:2,5:1,9; superfície coberta com pequenos dentículos. Maxila esquerda e direita semelhantes; placa interna aproximadamente triangular, com linha de cerdas; placa externa ampla; palpo biarticulado; artigo proximal curto, apicalmente dilatado com cerda marginal, seis cerdas espiniformes e duas cerdas submarginais. Maxila II bilobada, lóbulo interno ligeiramente mais curto do que externo; lóbulo externo com cerdas curvadas. Lóbulos internos bem desenvolvidos e largos, com quatro cerdas medio-distais, quatro cerdas apicais, e cinco cerdas medio-faciais; lóbulos externos com seis espinhos médio-apicais, cinco cerdas submarginais e quatro cerdas marginais. Palpo articulado na razão 1:1,8:1,1:0,80, artigo proximal sem cerda; segundo artigo com cerdas laterais; própodo com cerdas distais mesiais, dáctilos com três cerdas mesiais. Labium com lóbulos internos mal desenvolvidos.

Gnatópodes I-II. Base I alongada, com três cerdas marginais anteriores; quatro posteriores; ísquio com duas cerdas posteriores; mero com grupo facial médio de cerdas; espaçadas distalmente; carpo aproximadamente triangular, com uma cerda anterodistal, e uma cerda facial; própodo de forma gammaride, margens anteriores e posteriores subretangulares, largura : comprimento com proporções 1:2,1; palma ligeiramente oblíqua; margem anterior com quatro cerdas; quatro anteroapicais, margem posterior com uma linha de oito cerdas submarginais; canto palmar definido com uma cerda espiniforme; palma com cerdas. Dáctilo bem desenvolvido, um pouco mais longo que a palma. Base II mais alongada do que a base I, com duas cerdas anteriores; uma posterior; ísquio com uma cerda facial postero-distal, mero com cerda facial; carpo alongado, cerca de 1/2 da base e duas vezes maior que o própodo II. Própodo estreito, afunilando distalmente, margem anterior convexa, margem posterior reta, posterodistalmente produzindo um lóbulo com duas cerdas; margem anterior com quatro cerdas

submarginais médias e quatro cerdas distais, margem posterior com seis cerdas submarginais e cerdas inferiores minúsculas.

Pereópodes III-IV. Robustos, igualmente longos, com cerdas espaçadas ao longo das margens anteriores e posteriores de todos os artículos, dátilo com estrutura bem definida, com três cerdas dorsais minúsculas e três cerdas espiniformes ventrais.

Pereópodes V-VII. Pereópodes V: VI: VII nas proporções 1:1,6:1,6. Bases ovóides, sem lóbulos distais, margens anteriores e posteriores ligeiramente convexas, com seis cerdas posteriores; margens anteriores com quatro cerdas. Todos os artículos entre ísquio e própodo com grupos de cerdas anteriores e posteriores; própodo V-VII com seis, oito, oito ganchos de cerdas. Dátilo robusto, com cerdas dorso-proximais e dorso-distais; cada dátilo com quatro, oito, oito cerdas espiniforme ventrais.

Placas coxais – Largura das placas I-IV 0,65, 0. 59,0. 82 e 0. 97 (distâncias dorsoventrais). Placas coxais I-II sub quadradas, placas III-IV forma irregular na região ventral, margem côncava. Cinco cerdas ao longo das margens antero-distais, na coxa poucas cerdas faciais. Brânquias II-V pedicelárias e ovóides, progressivamente maior até brânquia IV que se estende além da base, brânquia V curta. Placas coxais V-VII sem lóbulos distintos, V com quatro cerdas ao longo da margem anterior e uma cerda posteroventral, VI com uma cerda anterior e 1 posteroventral; VII com cerda única. Oostegitos em pereópodes II, III, IV e V.

Urópodes. Urópode I ramo interior: ramo externo com proporções 1:0,82:0,85. Urópode I com ramo distal arredondado; ramo externo com aproximadamente 0,99 do ramo interno; ramo externo com sete cerdas espiniformes dorsais e cinco espinhos apicais; ramo interno com quatro cerdas de espiniformes dorsais. Urópode II ramo pontiagudo e não excede o comprimento do urópode I. Urópode III com ramo em forma de vara. Ramo interno com quatro grupos laterais misturados de cerdas plumosas e espiniformes, e com sete cerdas espiniformes apicais; artículo proximal do ramo externo com quatro grupos laterais de cerdas espiniformes e pelo menos duas espinhos mesiais simples; artículo distal com cerda robusta média mesial e quatro espinhos apicais. Ramo externo: ramo interno com proporções 1: 0,98, artículo distal medindo 0,31 do artigo proximal.

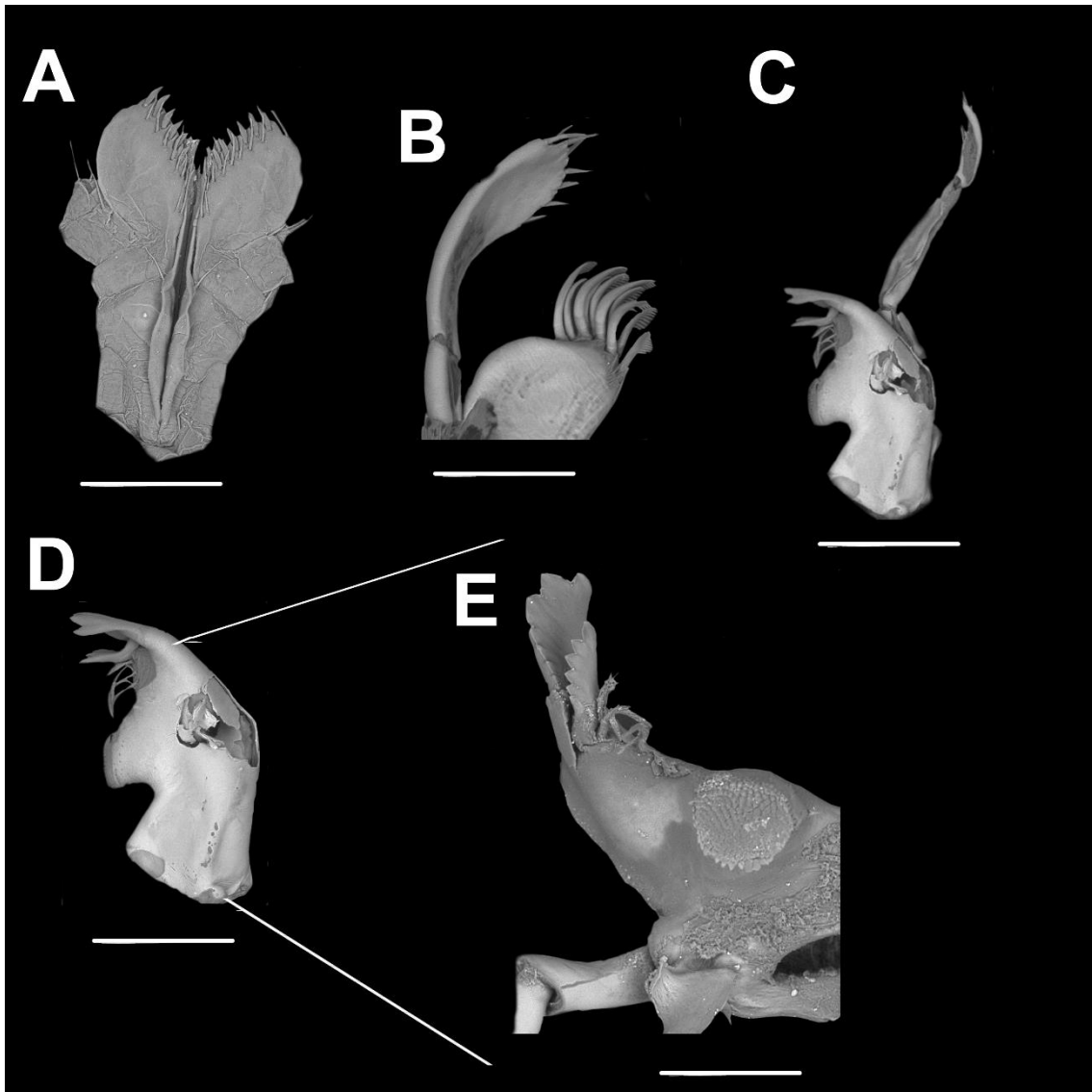


Figura 20- Peças bucais de *Potiberaba* sp. 4. **A-** Maxilípede esquerdo e direito, **B-** Maxila 1, **C- D** mandíbula e molar.

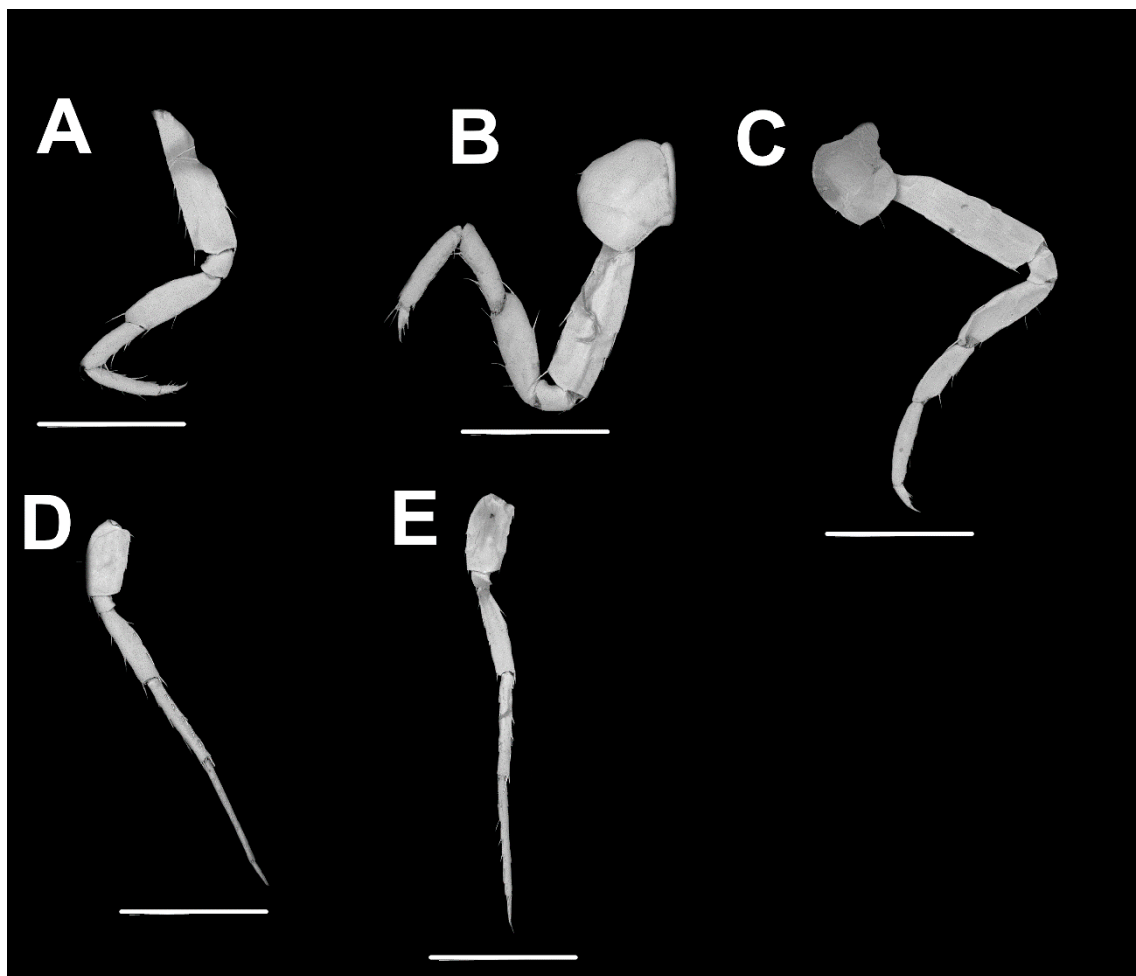


Figura 21- Pereópodes I – V de *Potiberaba* sp. 4.

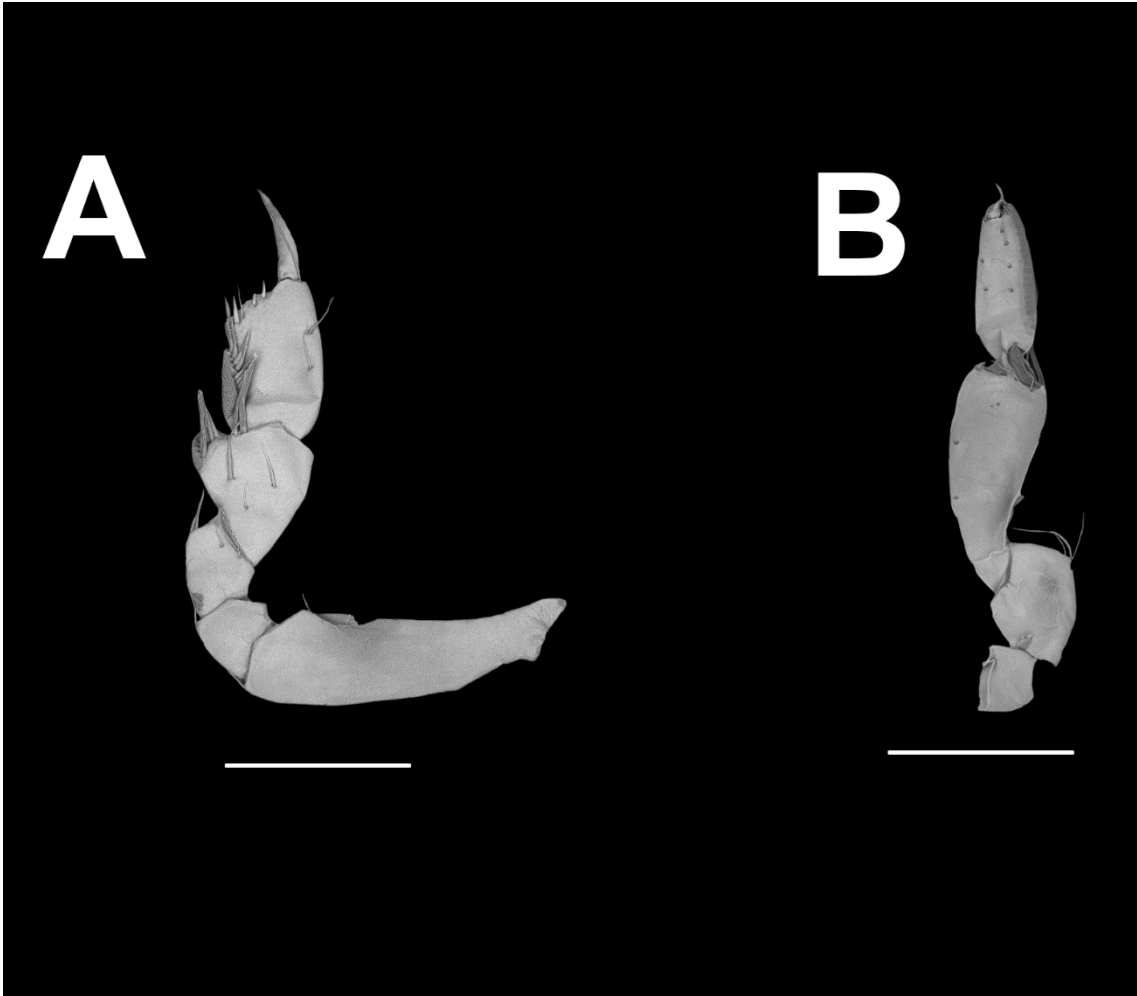


Figura 22- Gnatópodes I e II e *Potiberaba* sp. 4. **A-** Gnatópode I e **B-** Gnatópode II.

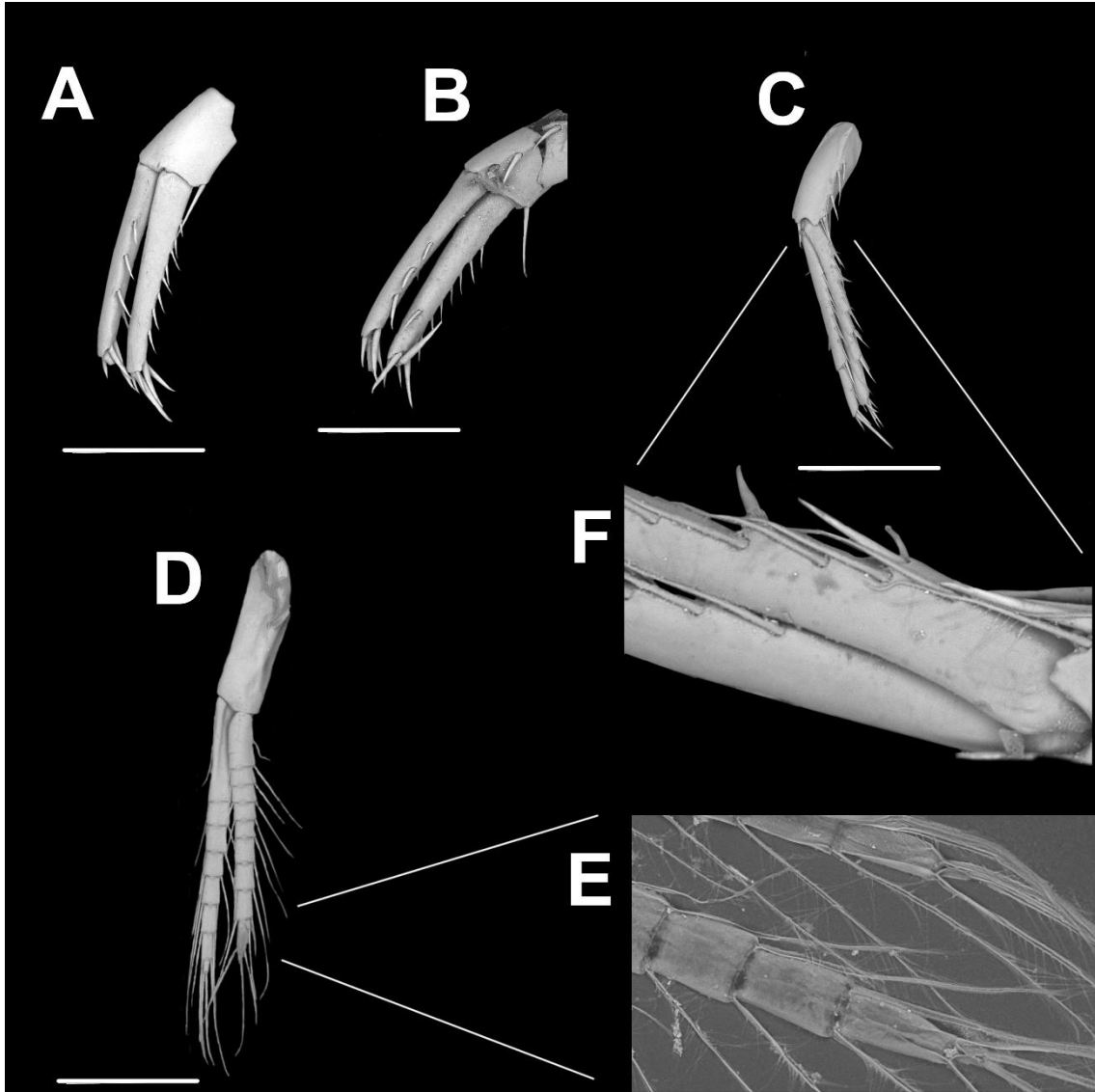


Figura 23- Urópodes e pleópode de *Potiberaba* sp. 4. **A – C** urópodes I -III, **D-** pleópode II, **E-** cerdas plumosas do urópode II, **F-** cerdas e espinhos do urópode III.

Discussão

As delimitações propostas por Bento *et al* (2020) para *Potiberaba* a partir de um marcador mitocondrial, indicaram a existência de cinco linhagens, sugerindo ao final do estudo, a presença de um complexo de espécies. Convergindo com o que foi sugerido por Bento *et al* (2020), os resultados obtidos através da análise *multiloci*, incorporando um marcador nuclear, indicaram a presença de estruturação de cinco possíveis linhagens de *Potiberaba*. Entretanto, quando analisado de forma isolada nas delimitações, o marcador nuclear divergiu quanto ao número de linhagens, incluindo *Potiberaba* sp. nov. 4 dentro do grupo *P. porakuara*.

Diferenças entre topologias e delimitações de linhagens entre marcadores de origens diferentes, como observado em *Potiberaba* sp. nov. 4 é algo recorrente (Esmaeili *et al* 2015), uma vez que, genes nucleares e mitocondriais apresentam características evolutivas distintas (Talavera *et al* 2011, Campilo *et al* 2019). Marcadores nucleares necessitam de mais tempo para que mutações surjam e sejam fixadas, quando comparados com marcadores mitocondriais, necessitando de mais tempo para atingir o monofiletismo recíproco, recuperando principalmente eventos antigos de divergência (Galtier *et al* 2009, Mandal *et al* 2014, Weigert *et al* 2016, Allio *et al* 2017), o que se acredita não ser aplicado a *Potiberaba* sp. nov. 4.

Divergindo do que é observado nas outras linhagens, *Potiberaba* sp. nov. 4, é encontrada em uma região que se sobrepõe a ocorrência de *P. porakuara*, levantando a hipótese de que *Potiberaba* sp. nov. 4 seja mais uma população de *P. porakuara*, assim como observado em espécies de *Niphargus*, onde populações com distribuições próximas ou sobrepostas, (possivelmente interconectadas), descritas como espécies distintas utilizando dados morfológicos, eram variações de uma espécie com alta plasticidade fenotípica (Fišer *et al* 2009, Meleg *et al* 2013, Stoch *et al* 2020). Entretanto, *Potiberaba* sp. nov. 4 é a única espécie do gênero registrada em área epicárstica, isolando os indivíduos em um único ponto da caverna sem conexão com outras regiões que pudessem permitir o fluxo de migrantes, fato similar ao observado em outros representantes de anfípodas do gênero *Niphargus*, e associado ao processo que deu origem a algumas das espécies mais recentes do gênero (Wellborn *et al* 2005, Delic *et al* 2017, Fišer *et al* 2017, Švara *et al* 2015).

Desse modo, diferente do que é proposto para *Potiberaba* sp. nov. 1, 2 e 3, *Potiberaba* sp. nov. 4 pode ter passado por processos como especiação recente, como indicado na árvore filogenética para *cox1*, sendo a última linhagem a divergir de *P. porakuara*, (Mammola *et al* 2018, Wang *et al* 2020). Com o incremento das informações morfológicas, outros marcadores moleculares, e características ecológicas do habitat dos indivíduos, a delimitação proposta por

Bento *et al* (2020), onde *Potiberaba* sp. nov. 4 é proposta como uma nova espécie, foi considerada válida.

Assim como observado em outros estudos taxonômicos, as divergências entre genes podem ser em parte, solucionadas com o incremento de outras formas de avaliação de diferenças entre grupos (Tan *et al* 2010, Pastori *et al* 2018, Cognato *et al* 2020). No estudo, as informações fenotípicas foram cruciais para separação em cinco linhagens morfológicamente distintas. O trabalho indicou convergência entre parte das informações genéticas e fenotípicas, corroborando a ideia da existência de um complexo de espécies, distintas em ambos os aspectos (moleculares e morfológico), com taxa de acerto na separação das linhagens em 100%, quando identificadas por caracteres morfológicos, permitindo assim a descrição das quatro novas espécies de *Potiberaba*, assim como a identificação de um espectro de variação morfológica e molecular em *P. porakuara*, que apresenta distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo em diversas cavernas da porção sul da Formação Jandaíra.

Os padrões de estruturação genética e fenotípica observados no estudo, são associados a linhagens separadas por barreiras impermeáveis ao fluxo de indivíduos (Hewitt *et al* 2000), como observado para as linhagens de *Potiberaba*, isoladas em diferentes microbacias, e em regiões geograficamente distantes, impedindo que ocorra troca de indivíduos entre *P. porakuara* e *Potiberba* sp. 1, 2, 3 e 4, permitindo assim o acúmulo de diferenças morfológicas e genéticas ao longo do tempo.

Entretanto, a possibilidade de fluxo de indivíduos entre regiões, pode ser um dos fatores responsáveis pelo padrão genético, geográfico e morfológico observado em *P. porakuara*. A espécie ocupa um conjunto de cavernas possivelmente conectadas, criando um grande sistema subterrâneo, desse modo, mesmo colonizando cavernas com as mais diversas feições ambientais, e apresentando diferenças fenotípicas que nesse exemplo, podem ser associadas ao ambiente (Finston *et al* 20007), os indivíduos constituem uma mesma espécie, uma vez que o fluxo de migrantes não é interrompido, Dessa forma, processos evolutivos como a especiação alopátrica, que pode ter levado ao surgimento das novas linhagens, não atuam da mesma forma em *P. porakuara* (Faille *et al* 2015).

Diferente disso, o isolamento geográfico observado nas linhagens de *Potiberaba* sp. nov. 1, 2,3 e 4, associado a populações reduzidas e restritas apenas a uma caverna cada, pode ter sido responsável por acentuar diferenças entre elas e *P. porakuara* (Winger *et al* 2015) através de processos evolutivos como a especiação alopátrica e deriva (Masel *et al* 2011), diferenciando as linhagens do ponto de vista genético, como observado nas topologias das

árvores filogenéticas, com clados monofiléticos com altos valores de suporte, e a presença de haplótipos exclusivos em cada linhagem. Além disso, do ponto de vista morfológico, selecionando e fixando características fenotípicas diferentes em cada localidade, permitindo que as linhagens possam ser distinguidas (Zamudio *et al* 2016).

Os locais de ocorrência, associados ao endemismo e a populações pequenas, contendo haplótipos exclusivos, são fatores preocupantes para algumas das linhagens. Com exceção de *Potiberaba* sp. nov. 1 e 2, das cavernas Furna Feia e Pedra Lisa, que estão no Parque Nacional da Furna Feia e portanto, protegidas de ações antrópicas danosas, as outras espécies, incluindo *P. porakuara*, estão situadas em áreas com potenciais impactos (Ferreira *et al* 2010). Dentre as quatro linhagens descritas no estudo, *Potiberaba* sp. nov. 3 pode ser a mais susceptível a tais impactos, uma vez que, o local de ocorrência da espécie, pequenas poças formadas por afloramento de água subterrânea, encontra-se ao lado de propriedades que retiram e represam água para agricultura, criação de animais e pesca (Ferreira *et al* 2010). Apesar de ser a linhagem menos abundante até o momento, *Potiberaba* sp. nov. 4 é encontrada numa porção de difícil acesso da caverna, numa região afastada de zonas utilizadas para agricultura ou qualquer outra atividade humana, diminuindo o risco de perda da espécie.

Apesar de ocorrer em áreas que também são impactadas por atividades humanas, como exploração mineral, vegetal, agricultura e pesca, *P. porakuara* apresenta distribuição ampla, habitando diversas cavernas com populações abundantes, maior diversidade genética e compartilhamento de haplótipos entre os locais de ocorrência, e variações fenotípicas ao longo de sua distribuição geográfica, que confere a espécie maior capacidade de colonização de diferentes ambientes, diminuindo assim o risco de perda de diversidade caso alguma localidade seja impactada, diferente do que foi observado para as quatro novas linhagens de *P. porakuara*. Entretanto, a ocorrência da espécie em cavernas utilizadas para turismo na região pode ser um fator preocupante, uma vez que, estudos anteriores já relatam como a atividade turística, quando não praticada de forma correta, pode influenciar de forma negativa a diversidade da fauna local (Wong *et al* 2004, Davenport *et al* 2006).

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

Referências

- Asenjo ARA, Zampaulo, Lopes FR. (2013) "Two new troglobitic species of Oxarthrius Reitter (Coleoptera, Staphylinidae, Pselaphinae) from Brazil." *Zootaxa* 4462, n. 3, v. 13, p.404-414.
- Allio R, Stefano D, Nicolas G, Benoit N. (2017). "Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker." *Molecular Biology and Evolution*. n. 11, p. 2762-2772.
- Bilandžija H, Breanna H, Mireille S, Guanliang M, Mandy N, Andrew D KRG. (2020) "Phenotypic plasticity as a mechanism of cave colonization and adaptation." *Elife*. n. 9, p. 51830
- Baptista RLC, Aluiz PLG. (2002) "A new troglomorphic Charinus from Brazil (Arachnida: Amblypygi: Charinidae)." *Revista Ibérica de Aracnología*. n. 6, p. 105-110.
- Bento DM. (2011) "Diversidade de invertebrados em cavernas calcárias do oeste potiguar: subsídios para a determinação de áreas prioritárias para conservação." Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Barreiro, R.M.C. & Senra, M.C.E. (2007). Contribuição ao conhecimento do registro de Trypanites em depósitos coniacianos da Formação Jandaíra, Bacia Potiguar (Rio Grande do Norte). In: CARVALHO, I.S. et al. (eds.) Paleontologia: cenários da vida, seção 3: Floras e faunas do Mesozóico. Editora Interciência. n. 3, p. 551-557.
- Bauza-Ribo MM., Carlos J, Francesco N, Pedro O, Joan PDJ. (2012). "Genomic phylogenetic analysis supports continental-scale vicariance in subterranean thalassoid crustaceans." *Current Biology*. n. 22, v. 21, p. 2069-2074.
- Bogdanov ASLA, Khlyap MIB. (2020). "Differentiation and Phylogenetic Relationships of Three Pine Vole Species of the Subgenus Terricola (Rodentia, Arvicolinae, Microtus): Results of Analysis of the BRCA1 and XIST Nuclear Gene Fragments." *Biology Bulletin*. n. 6. v. 47, p. 559-563.
- Bickford D, David JL, Navjot SS, Peter KLN, Rudolf Meier KW, Krista K. Ingram, and Indraneil Das.(2007). "Cryptic species as a window on diversity and conservation." *Trends in ecology & evolution*. n. 3, v. 47, p. 148-155.
- CECAV/ICMBio - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas. Base de Dados Geoespacializados de Cavidades Naturais Subterrâneas, situação em 31/12/2018.
- Culver DC. 1982. Cave life: evolution and ecology. Harvard University Press (USA).
- Costa N, Pedro LG, Ferreira RD. (2003). "Identificação de áreas prioritárias para conservação da biogeodiversidade no estado de Goiás." *Boletim Goiano de Geografia*. n. 1, v. 23, p. 41-58.
- Carlini DB, John M, Patrick G, Sullivan DW, Fong.(2009). "Molecular genetic variation and population structure in morphologically differentiated cave and surface populations of the freshwater amphipod Gammarus minus." *Molecular Ecology*. n. 9, v. 18, p. 1932-1945.
- Caviedes-Solis IW. (2015). Uprooting phylogenetic uncertainty in coalescent species delimitation: A meta-analysis of empirical studies. *Current Zoology*. n. 61, v. 5, p. 866-873.
- Culver DC, 1982, Cave Life. Evolution and Ecology: Cambridge, Harvard University Press.
- Cassab, RCT. (2003). Paleontologia da Formação Jandaíra, Cretáceo Superior da Bacia Potiguar, com ênfase na paleobiologia dos gastrópodos. Programa de Pós-Graduação em Geologia. Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, tese de doutorado. p. 184.

- Christian E. (1987). "Composition and origin of underground arthropod fauna in an extrazonal permafrost soil of central Europe." *Biology and fertility of soils*. n. 1, v. 3, p. 27-30.
- Campillo LC, Kevin JB, Robert GM, Joseph D. (2019). Manthey. "Mitochondrial genomes of the bird genus *Piranga*: Rates of sequence evolution, and discordance between mitochondrial and nuclear markers." *Mitochondrial DNA Part B* 4, n. 2, v. 6, p. 2566-2569.
- De Ázara LN, Rodrigo LF. (2014). "Two new troglobitic *Newportia* (*Newportia*) from Brazil (Chilopoda: Scolopendromorpha)." *Zootaxa*. 3881, n. 3, v. 3881, p. 267-278.
- Delić T, Vid Š, Charles OC, Peter T, Cene F. (2017). "The giant cryptic amphipod species of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea, Amphipoda)." *Zoologica scripta*. n. 6, v. 46, p. 740-752.
- Delic T, Peter T, Michal R, Cene F. (2017). "The importance of naming cryptic species and the conservation of endemic subterranean amphipods." *Scientific Reports*. n. 1, v. 7, p. 1-12.
- Duarte RC. (2008). "Respostas fenotípicas de juvenis do caranguejo verde *carcinus maenas* (decapoda, brachyura) à pistas químicas liberadas por co-específicos adultos." (2008): 53-f.
- Daly BJ, Ginny L, Eckert W. (2020). Christopher Long. "Moulding the ideal crab: implications of phenotypic plasticity for crustacean stock enhancement." *ICES Journal of Marine Science* (2020).
- Esmaeili-Rineh S, Alireza S, Teo D, Ajda M, Cene F. (2015). "Molecular phylogeny of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) in the Middle East: a comparison with European *Niphargids*." *Zoological Journal of the Linnean Society*. n. 4, v. 175, p. 812-826.
- Eme D, Zagamajste M, Delić T, Fišer C, Flot JF, Konecny- Dupré L, Malard F. (2018). Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*, n. 2, v. 41, p. 424-436.
- Esmaeili-Rineh S, Alireza S, Teo D, Ajda M, Cene F. (2015). "Molecular phylogeny of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) in the Middle East: a comparison with European *Niphargids*." *Zoological Journal of the Linnean Society*. n. 4, v. 175, p. 812-826.
- Finston TLMS, Johnson WF, Humphreys S M, Eberhard SAH. (2007). "Cryptic speciation in two widespread subterranean amphipod genera reflects historical drainage patterns in an ancient landscape." *Molecular Ecology* 16, n. 2, v. 16, p. 355-365.
- Faille A, Charles B, Xavier B, Javier F. (2010). "Especiação alopatrica ilustrada: o gênero hipógeno *Geotrechus* Jeannel, 1919 (Coleoptera: Carabidae: Trechini), com descrição de quatro novas espécies dos Pirenéus Orientais (Espanha)." *Arthropod Systematics & Phylogeny*. n. 3, v. 73, p. 439-455.
- Ferreira RL., Erica MK, Gina Barcelos Pontes, Sabrina S. Pinheiro Almeida, Vinícius Albano Araújo, and Vinícius Rangel Cardoso Teixeira.
- Ferreira RL, Cardoso RC, Silva MS. (2016). Composição, riqueza e diversidade de invertebrados em cavernas de Dianópolis (TO). *Revista Brasileira de Espeleologia*. n. 2, v. 7, p. 01-18.
- Fujita, MK., Leache, AD, Moritz C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. n. 27, v. 9, p. 480-488.
- Fišer C. (2019). *Niphargus*—A model system for evolution and ecology. In *Encyclopedia of caves*. Academic Press.
- Fišer C, Zagamajster M, Ferreira RL. (2013). Two new Amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. *Syst and Bio*, n. 11, v. 2, p. 117-139.

- Ferreira RL, Prous X, de Oliveira Bernardi LF and Souza-Silva M. (2010). Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: caracterização e impactos. *Rev Bra Espel*, n. 1, v. 1, p. 25-51.
- Galan Carlos. "Fauna cavernícola de la Sierra de Aralar." *Ecología, taxonomía y evolución. Sociedad deficiencias Aranzadi* (2004).
- Galtier N, Benoit Nabholz S, Glémin GDD. (2009). "Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal." *Molecular ecology*. n. 18, v. 22, p. 4541-4550.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes* 5:712–715
- Hou ZE, Shnqiang Li. (2002). "Two new species of troglobitic amphipod crustaceans (Gammaridae) from Hubei Province, China." *Raffles Bulletin of Zoology* 50, n. 1, v. 50, p. 27-36.
- Hacker, Jörg, and Elisabeth Carniel. (2005) "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity." *EMBO reports* 2, n. 5, v. 2, p. 376-381.
- Hoekstra HE, Krenz JG, Nachman MW. (2005). Local adaptation in the rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*): Natural selection and phylogenetic history of populations. *Heredity* (Edinb). n. 94, v. 2, p. 217–228.
- Hellmann LL, Ferreira RL. (2018). Two new sympatric troglobitic freshwater flatworms (Platyhelminthes: Dugesidae) from a hotspot of subterranean biodiversity in the Neotropics. *Zootaxa*, n. 4438, v. 3, p. 561.
- Hewitt G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. n. 405, v. 6789, p. 907–913.
- Iniesta LFM, Ludson NÁ, Marconi SS, Rodrigo LF. (2013). "Biodiversidade em sete cavernas no Parque Estadual do Sumidouro (Lagoa Santa, MG)." *Revista Brasileira de Espeleologia*. n. 2, v. 2, p. 18.
- Jones R, Culver DC and Kane TC. (1992). Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? *Evolution*. n. 46, v. 4, p. 353–365.
- Kaczmarek ŁJC, Krzysztof Z, Dawid D, Łukasz M. (2014). "Tardigrades from Peru (South America), with descriptions of three new species of Parachela." *Zootaxa*. n. 2, v. 3790, p. 357-379.
- Leal-Zanchet AM, Stella TS, Rodrigo LF. (2014). "A new genus and species for the first recorded cave-dwelling Cavernicola (Platyhelminthes) from South America." *ZooKeys*. n. 2, v. 442, p. 1.
- Lefébure TCJ, Douadl FM, Janine G. (2007). "Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*)." *Molecular phylogenetics and evolution*. n. 3, v. 42, p. 676-686.
- Li J, Yixiong C, Arthur C. (2006). "A new species of troglobitic freshwater prawn of the genus *Macrobrachium* from southern China (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae)." *Raffles Bulletin of Zoology*. n. 2, v. 54, p. 277-282.
- Leigh JW, Bryant D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. n. 6, p. 1110–1116.
- Lins L, Simon YW, Nathan LO. (2017). An evolutionary timescale for terrestrial isopods and a lack of molecular support for the monophyly of Oniscidea (Crustacea: Isopoda). *Organisms Diversity & Evolution*. v. 17, n. 4, p. 813-820.
- Masel J. (2011). "Genetic drift." *Current Biology* 21, n. 20, v. 21, p. 837- 838.
- Maia KP, Sérgio LSB, Eleonora T. (2013). "Ecologia populacional e conservação de eglídeos (Crustacea: Decapoda: Aeglidae) em cavernas da área cárstica do Alto Ribeira, em São Paulo." *Revista da Biologia*.

- Mandal S, Liansangmawii C, Guruswami G, Nachimuthu SK. (2014). "Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects—A Review." *DNA Barcodes*. n. 1, v. 2, p. 1-9.
- Mammola S, Miquel A, Arnedo PP, Elena P, Nicolò C, Marco I. (2018). "Ecological speciation in darkness? Spatial niche partitioning in sibling subterranean spiders (Araneae: Linyphiidae: Troglodyphantes)." *Invertebrate Systematics*. n. 5, v. 32, p. 1069-1082.
- Naruse T, Peter KL, Daniele G. (2008). "Two new genera and two new species of troglobitic false spider crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Hymenosomatidae) from Indonesia, with notes on *Cancrocaeca* Ng, 1991." *Zootaxa*. n. 1, v. 1739, p. 21-40.
- Ng J, Landeen EL, Logsdon RM, Glor RE. (2013). Correlation between *Anolis* lizard dewlap phenotype and environmental variation indicates adaptive divergence of a signal important to sexual selection and species recognition. *Evolution*. n. 67, v. 2, p. 573–582.
- Østbye K, Eivind Ø, Anne ML, Laura RL, Stein-Erik L, David BC. (2018). "Morphology and life history divergence in cave and surface populations of *Gammarus lacustris* (L.)." *PloS one*. n. 10, v. 13, p. 58.
- Pastori T, Lilian E, Tatiana TSC, Olivier C. (2018). "Iterative taxonomy based on morphological and molecular evidence to estimate species boundaries: a case study in *Cypella* (Iridaceae: Iridoideae)." *Plant Systematics and Evolution*. n. 9, v. 304, p. 1117-1140.
- Pavón-Vázquez CJ, García-Vázquez UO, Bryson RW, Feria-Ortiz M, Manríquez-Morán NL, de Oca AN-M. (2018). Integrative species delimitation in practice: Revealing cryptic lineages within the short-nosed skink *Plestiodon brevirostris* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. n. 3, v. 10, p. 242–257.
- Porco D, Thibaud DLD, Samuel W, James DS, Christer EKR (2013). "Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America." *Biological Invasions*. n. 4, v. 15, p. 899-910.
- Prous X. (2005) "Entradas de cavernas: interfaces de biodiversidade entre ambientes externos e subterrâneos." *Distribuição dos artrópodes da Lapa do Mosquito, Minas Gerais* (2005).
- Puillandre NA, Lambert S, Brouillet, G. Achaz. (2012). "ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation." *Molecular Ecology*. n. 21, v. 8, p. 1864–77.
- Pons J. (2006). "Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects." *Systematic Biology*. n. 55, v. 4, p. 595–609.
- Pipan T, David CC. (2012). "Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment." *Biological journal of the Linnean Society*. n. 1, v. 107, p. 1-14.
- Poulson TL, White WB. (1969). The cave environment. *Science*. n. 165, v. 3897, p. 971-981.
- Pellegrini TG, Faria LDB, Ferreira RL. (2020). Temporal diversity patterns of benthic insects in subterranean streams: a case study in Brazilian quartzite caves. *Hydrobiologia*. n. 847, v. 11, p. 2417-2431.
- Regier JC, Shultz JW, Kambic RE. (2005). Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 272, n. 1561, p. 395-401.
- Rendoš M, Peter L, Andrej M. (2018) "Terrestrial isopods associated with shallow underground of forested scree slopes in the Western Carpathians (Slovakia)." *ZooKeys*. v. 801, p. 323.
- Richmond JQ, Reeder TW. (2002). Evidence for parallel ecological speciation in scincid lizards of the *Eumeces skiltonianus* species group (Squamata: Scincidae). *Evolution*. v. 56, n. 7, p. 1498–1513.

- Rodrigues FP. (2018). "MARCADORES MOLECULARES COI, 28S E GP-9 COMO FERRAMENTAS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Solenopsis* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)." *Revista Científica UMC* 3, n. 3.
- Silva MS, Iniesta LFM, Ferreira RL. (2020). Invertebrates diversity in mountain Neotropical quartzite caves: which factors can influence the composition, richness, and distribution of the cave communities? *Subterranean Biology*. v.33, n. 23.
- Silva KK. "Avaliação da produtividade primária bruta da caatinga do semiárido paraibano." (2019).
- Singhal SCJ, Hoskin PC, Sally P, Craig M. (2018). "A framework for resolving cryptic species: a case study from the lizards of the Australian wet tropics." *Systematic Biology*. n. 6, v. 76, p. 1061-1075.
- Souza-Silva M., Martins RP, Ferreira RL. (2011). Trophic Dynamics in Neotropical Limestone Cave: *Subterranean Biology*, v. 9, p. 127–138. doi:10.3897/subtbiol.9.2515.
- Simões MH, Souza-Silva M, Ferreira RL. (2015). Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics: *Subterranean Biology* 16: 103–121. doi:10.3897/subtbiol.16.5470.
- Senra MCE. (1997). Revisão da classificação da superfamília Ostreoidea (Mollusca-Bivalvia) da Formação Jandaíra – Cretáceo Superior da Bacia Potiguar (Rio Grande do Norte, Brasil). Programa de Pós-Graduação em Geologia, Instituto de Geociências – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Souza-Lima W, Andrade EJ, Srivastava NK. (2007). A Bioestratigrafia esquecida: amonóides da Bacia Potiguar. In: CARVALHO, I.S. et al. (eds) *Paleontologia: Cenários da Vida*, Rio de Janeiro, Editora Interciência. v. 3, p. 601-619.
- Smith MAW, Hallwachs DH, Janzen JT, Longino MGB. (2020). "A subterranean ant *Acanthostichus* Mayr, 1887 is revealed in Costa Rica." *Insectes Sociaux*. p. 1-4.
- Souza S, Marta R, Rodrigo LF, Ana LZ. (2018). "An integrative taxonomic approach reveals the first marine triclad (Platyhelminthes) trapped in a cave from a semiarid Neotropical environment." *Invertebrate Systematics*. n. 3, v. 32, p. 627-638.
- Souza MFVR, Rodrigo LF. (2010). "Eukoenia (Palpigradi: Eukoeniidae) in Brazilian caves with the first troglotic palpigrade from South America." *The Journal of Arachnology*. n. 3, v. 38, p. 415-424.
- Santos NMC. (2020). "Novas espécies de Troglaphysa Mills (Arthropoda: Collembola) de um complexo de cavernas em Minas Gerais, Brasil." Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Santos JGA, Ferreira RL. (2021). Three new species of *Eusarcus* Perty, 1833 (Opiliones, Gonyleptidae) from Brazilian caves. *European Journal of Taxonomy*, v. 740, p. 36-54.
- Tan DSH, Yuchen AGS, Lim MRBI, Rudolf M. (2010). "From 'cryptic species to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrosoma* (Sepsidae: Diptera)." *Zoologica Scripta*. n. 1, v. 39, p. 51-61.
- Travassos LEP, Rosa LGID. (2008). Varella. "Áreas cársticas, cavernas e a Estrada Real." *Pesquisas em Turismo e Paisagens Cársticas*. n. 2, v. 1, p. 107-120.
- Travassos LEP. (2013). "O carste e as cavernas nas obras de Alexander von Humboldt." *Biblio 3W* 18, n. 1034.
- Trajano EIF. (2010). Políticas de conservação e critérios ambientais: princípios, conceitos e protocolos." *estudos avançados* 24, n. 68, v. 24, p. 135-146.

Vadell M. (2003). "Fauna invertebrada de las cavidades del barranc de Sa Coma del Mal Pas (Calvià i Palma, Mallorca)." *Endins: publicació d'espeleologia*. p. 107-116.

Wang X, Zhixin Z, Stefano M, Adeljean H, Yanhong Z, Geng Q, Qiang L. (2020). "Revisiting the 'Marine Speciation Paradox' using genomic, morphometric, and ecological evidence in pipefish." *Authorea Preprints* (2020).

Wang JJ, Bradburd GS. (2014). Isolation by environment. *Mol Ecol*. v. 23, n. 23, p. 5649–5662.

White WB, Culver DC (Eds.). (2011). *Encyclopedia of caves*. Academic Press.

Winger BM, Bates JM. (2015). The tempo of trait divergence in geographic isolation: Avian speciation across the Marañón Valley of Peru. *Evolution*. n. 69, v. 3, p. 772–787.

Wolfe JM, Jesse W, Breinholt KA, Crandall AR, Lemmon EML, Laura ET, Mark ES, Heather D. (2019). Bracken-Grissom. "A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapod crustaceans." *Proceedings of the Royal Society B* 286. n. 1901, v. 286, p. 20190079.

Xing JC, Hannelore H, Xiang-Sheng C. (2013). "New replacement name for the planthopper genus Potiguara Hoch et Ferreira, 2013 (Hemiptera: Fulgoromorpha: Kinnaridae)." *Zootaxa* . n. 3, v. 3734, p. 400-400.