



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

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

**NATHALIA KALUANA RODRIGUES DA COSTA**

---

Dissertação de Mestrado  
Natal/RN, Agosto de 2022

**NATHALIA KALUANA RODRIGUES DA COSTA**

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

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

Orientador: Adrian Antonio Garda

Co-orientador: Sergio Maia Queiroz Lima.

**Agosto 2022**

**Natal/RN**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Costa, Nathalia Kaluana Rodrigues da.

Filogeografia do grilo Endecous potiguar Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 (Orthoptera, Phalangopsidae): Investigaçã de linhagens crípticas em cavernas na formação Jandaíra / Nathalia Kaluana Rodrigues da Costa. - 2023.

66 f.: il.

Dissertaçã (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduaçã em Sistemática e Evoluçã.

Orientador: Prof. Dr. Adrian Antonio Garda.

1. Biologia subterrânea - Dissertaçã. 2. Vicariância - Dissertaçã. 3. Evoluçã molecular - Dissertaçã. 4. Espécies crípticas - Dissertaçã. 5. Estase morfológica - Dissertaçã. I. Garda, Adrian Antonio. II. Título.

**NATHALIA KALUANA RODRIGUES DA COSTA**

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

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

APROVADA EM 30/08/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Felipe Camurugi Almeida Guimarães  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Dra. Thais Giovannini Pellegrini  
BioEspeleo Consultoria Ambiental

---

Dr. Adrian Antonio Garda  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
(Orientador)

“O mundo não é, está sendo” Paulo Freire

Dedico para Nathalia Kaluana de 2010 que sonhou pela primeira vez em ser bióloga: Você não só se tornou, como trabalhou com pesquisa em uma coisa que você sempre sonhou. O caminho não foi tal qual você romantizou, mas você conseguiu, e além disso, sua pesquisa contribuiu de alguma forma para elucidar os estudos de evolução biológica em tempos de tanto negacionismo.

## AGRADECIMENTOS

Confesso que fazer o mestrado sempre foi um sonho desde o Ensino Médio. Não tem como começar esses agradecimentos sem ser pela minha base: minha mãe, minha avó, meu padrasto e minha irmã. Vocês que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse ter uma formação de qualidade. Vocês que me deram coragem e conforto para que eu pudesse seguir.

Mas fazer um mestrado em plena uma pandemia, isso eu confesso que eu nunca tinha imaginado. E é por isso que eu não posso deixar de agradecer a pessoa que fez tudo isso acontecer: Diego Bento. Em um mundo de constante desvalorização da ciência, Didi nos oferece diariamente uma esperança. Você, Diego, me acalmou nas minhas maiores inseguranças e dificuldades. Você diminuiu as barreiras que a pandemia causou. Graças ao seu amor pela ciência e por caverna. Obrigada demais, meu amigo! Que você possa continuar com esse seu amor e que possa chegar em mais pessoas.

Meu sonho era trabalhar com evolução e genética, não importava o bicho! Agora trabalhar a graduação toda com peixes e no mestrado começar a trabalhar com grilo já era demais! Mas eu fui. Confiei e fui. E o universo colocou um anjo na minha vida. Pirilo, se não fosse por você eu também não teria conseguido! Você com toda sua paciência, dedicação se esforçou e compartilhou seu saber comigo. Muito obrigada por também ter diminuído a barreira de aprendizado que essa pandemia causou. Obrigada por sempre ter me incentivado com todo seu amor por grilos.

Adrian e Sergio obrigada por terem se esforçado tanto para passar por uma tela de computador grande parte dos conhecimentos que adquiri para minha dissertação. Eu sei que não foi fácil e vocês fizeram com muita excelência! Aos professores Marconi e Rodrigo do CEBS meu muito obrigada por toda a estrutura. Ao

meu amigo Latagan, obrigada pelo riso de todas as coletas, pela confiança que você passava para mim e por 90% dos grilos que coletei.

Ao Lab. de Fauna Aquática por ter feito parte da minha formação desde os primeiros períodos da graduação. Em especial aqueles que me acompanharam nessa jornada. Matheus Arthur, obrigada por ter me dado o pontapé para estudar cavernas. Val, obrigada pelas coletas que eram mais leves e incríveis por te ter por perto. Sávio, obrigada por ter sido tão suporte para mim na graduação. Quando eu tava com dúvidas e você nunca hesitava em parar seu trabalho para me ensinar. Flavinha, Yasmin e Carol, minha jornada na graduação foi muito significativa porque eu tinha vocês também. Vocês como pesquisadoras sempre me incentivaram e durante muitos perrengues eu pensava “Como será que as meninas agiriam nessa situação?”. Obrigada por fazerem a ciência ter uma voz feminina! Aninha, como não agradecer por toda a leveza e gargalhada que você me roubou nessas etapas? Obrigada demais! E para galera que tá pensando em começar essa jornada no ambiente subterrâneo, eu digo que vocês não vão se arrepender e agradeço também a vocês!

Um agradecimento em especial a minha nova família que eu ganhei através da minha namorada. Que me deram todo suporte nessa reta final. Jacinta e Tete, amo vocês! As minhas amigas que sempre me incentivaram e dividiram essa etapa comigo: Ju, Bel e Liv, que honra nosso encontro! Clau, não há como esquecer de você, né? Obrigada por toda vez que eu me perdi, você com toda sua medicina terapêutica fez com que eu voltasse e me conectasse comigo. Obrigada demais!

À CAPES, ao ICMBio/CECAV e ITV-DS, obrigada por todo o apoio logístico e financeiro para tornar essa pesquisa real.

## RESUMO

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

**Palavras-chave:** Biologia subterrânea; Vicariância; Evolução molecular; Espécies crípticas; estase morfológica.

## ABSTRACT

Cave crickets of the Phalangopsidae family are poorly studied, have low dispersal capacity, and wide distribution, making them an interesting system for phylogenetic and phylogeographic investigations. Within this family is the genus *Endecous*, which has been subdivided into three subgenera based on morphological characters and has most of its type localities in caves. Currently, all taxonomic research involving the genus uses morphological, bioacoustic and cytogenetic data. Here, we reconstruct the phylogeny and phylogeography of *E. potiguar* Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017 based on 151 partial sequences of the COX-1 gene with 571 bp for 21 different localities. Molecular phylogenies were reconstructed using Bayesian inference and Maximum Likelihood. Three approaches (ABGD, PTP and GMYC) were used for lineage delimitation. A Bayesian Analysis of Population Structure was performed using BAPS. Additionally, some specimens were selected for extraction of the phallic complex and analysis of morphological characters based on the original species description (Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017). Some acoustic samples were also used for analysis. The Bayesian analysis suggested two clades, here treated as two possible species. These clades were supported by two of the three delimitation analyses, except for the PTP that followed the division made by Maximum Likelihood into three clades. The divergence time estimate suggests that this speciation occurred 7.40 Ma (95% HPD 13.80-3.75 Ma) ago. The initial divergence between the species is possibly correlated with a mechanism of vicariance after the emergence of the channel that would give rise to the Apodi-Mossoró River, in the period between the Miocene and the Quaternary. With the decrease in humidity, these species may have dispersed to caves with recent divergence times between the groups. We observed a morphological stasis, perhaps the result of a stabilizing selection due to niche conservatism.

**Keywords:** Subterranean Biology; Vicariance; Molecular evolution; Cryptic species; morphological stasis.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Esclerito fálco de *Endecous* em vista lateral. A, *Endecous (Pedroecous) apterus*, imagem extraída de Souza-Dias *et al.* (2014). B, *Endecous (Endecous) painenesis* Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2020), imagem extraída de Castro-Souza *et al.* (2020). C, *Endecous. (Notendecous) potiguar*, trabalho atual.

**Figura 02.** Distribuição das 14 espécies do gênero *Endecous* ao longo do Brasil de acordo com a localidade-tipo. *Endecous (Endecous) arachnopsis* Saussure, 1878 não possui sua localidade-tipo bem definida e por essa razão não foi representada no mapa. O losango destaca as espécies troglóbias.

**Figura 03.** Localização das cavernas com registros de ocorrência de *Endecous potiguar*. Em verde as cavernas sequenciadas no atual trabalho e em vermelho as que não foram sequenciadas, mas possuem ocorrência.

**Figura 04.** *Endecous (Notendecous) potiguar*, esclerito fálco do parátipo (ISLA 21058) utilizado por Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2017). 1- Vista dorsal. 2- Vista ventral. 3-Vista frontal. 4- Vista diagonal. Convenções Seguindo Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2017): Ps.Arm = braço do esclerito pseudopifálco; Ps.db = ramo dorsal do esclerito pseudopifálco; Ps.im = projeção interior do esclerito pseudopifálco; Ps.ib = barras interiores do esclerito pseudopifálco; Ps.ms = escudo membranoso do esclerito pseudopifálco; Ps.vb = ramo ventral do esclerito pseudopifálco; Ps.P1 = parâmero 1 pseudopifálco; Ps.P2 = parâmero 2 pseudopifálco; Ps.Pi = projeção interior do parâmero pseudopifálco; r. = ramo; Ect.Arc = arco ectofálco; Ect.mp = projeção mediana do esclerito ectofálco; Ect.lb = barras laterais do esclerito ectofálco; Ect.Ap = apódema do ectofálo.

**Figura 05.** Demonstração didática de como ocorreram as gravações acústicas dos espécimes coletados.

**Figura 06.** Parâmetros acústicos analisados no software RavenPro 1.6.3

**Figura 07.** Representação das cavernas analisadas para estudos moleculares (A). Árvore filogenética de consenso resultantes da inferência bayesiana com relógio molecular (B). Em cada nó das árvores são representados os valores de probabilidade posterior (abaixo) e a idade média estimada (acima). As barras roxas representam os intervalos com 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de apresentação o grupo externo foi retirado.

**Figura 08.** Divisão populacional sugerida pelo BAPS em 4 populações.

**Figura 09:** Rede de haplótipos do gene *cox-1*. As marcas de hachura entre os pontos pretos representam um passo mutacional, a área do círculo dos haplótipos é proporcional ao número de indivíduos e a cor identificam a espécie.

**Figura 10.** Dinâmica espacial do grilo *Endecous potiguar* projetada no Google Earth reconstruída a partir dos estados de localização da árvore MCC. Em A é representado o primeiro centro de origem datada em milhares de anos. Em B a segunda diversificação, em C a terceira e em D a última. As imagens foram retiradas do software Google Earth.

**Figura 11.** Representação do esclerito fálico na vista dorsal. As setas vermelhas e verdes apontam para o braço do esclerito pseudepifálico (Ps.arm). As setas em vermelho destacam as estruturas curvadas, já em verde estão as estruturas lineares. Já as setas azuis e laranja apontam para o ramo dorsal do esclerito pseudepifálico (Ps.db). As setas em azul destacam estruturas ligeiramente curvadas para dentro, já em laranja estão as estruturas ligeiramente curvadas para fora. \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

**Figura 12.** Representação do esclerito fálico na vista diagonal. As setas apontam para o ramo ventral do esclerito pseudepifálico (Ps.vb). \*Trata-se do parátipo de *E. potiguar*.

**Figura 13.** Representação do esclerito fálico na vista frontal. As setas vermelhas apontam para o Parâmetro 1 pseudepifálico (Ps.P1). As setas verdes apontam para o Parâmetro 2 pseudepifálico (Ps.P2) \*Trata-se do parátipo de *E. potiguar*.

**Figura 14.** Representação do esclerito fálico na vista frontal. As regiões destacadas apontam para a projeção interior do parâmetro pseudoepifálico (Ps.Pi). \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

**Figura 15.** Representação do esclerito fálico na vista ventral. \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

**Figura 16.** Primeira e segunda dimensões do escalonamento multidimensional dos escores de proximidade de Random Forest considerando características acústicas e morfométricas de 12 espécimes de *Endecous potiguar* em margens opostas do Rio. As cores indicam os clados comparados: Azul margem esquerda, vermelho margem direita.

**Figura 17.** Importância das variáveis baseada no decréscimo de acurácia e no índice de Gini.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01.** Dados das cavernas coletadas e informações do material que foi coletado para análise nesta dissertação. As abreviações significam: MOL – dados moleculares. MOR – dados morfológicos e ACUS – dados acústicos. \*O material analisado corresponde ao localidade-tipo de *Endecous potiguar*.

**Tabela 02.** Distâncias genéticas médias (K2P) intraespecíficas (na diagonal, em negrito) entre as diferentes linhagens identificadas.

**Tabela 03.** Índices de diversidade populacional e estatísticas de testes de neutralidades para o Cox1 dos espécimes analisados. Número de sequências (N), número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1; Populações de acordo com os resultados do BAPS apresentados na figura 06. \*  $P < 0.05$ .

**Tabela 04.** Resumo dos caracteres morfológicos analisados para *Endecous potiguar* seguindo o artigo de descrição proposto por Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017.

**Tabela 05.** Matriz de confusão (*Confusion Matrix*), mostrando os erros de classificação obtidos na análise.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Evolução em ambientes subterrâneos .....	17
1.2 Conceito de Espécie .....	19
1.3 Gênero <i>Endecous</i> Saussure, 1878 .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 Objetivo Geral .....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Área de Estudo .....	24
3.2 Coleta de espécimes de <i>E. potiguar</i> .....	28
3.3 Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA .....	28
3.4 Análise de Dados Moleculares .....	29
3.5 Dados Morfológicos.....	33
3.6 Dados Bioacústicos.....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 Análises filogenéticas e delimitação de linhagens .....	37
4.2 Estruturação populacional .....	39
4.3 Distâncias genéticas .....	40
4.4 Análise demográfica e diversidade genética .....	41
4.5 Reconstrução filogeográfica e centro de origem.....	42
4.6 Distinções Morfológicas .....	43

4.7 Análises Bioacústicas.....	53
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1 Espécies crípticas .....	54
5.2 Diversificação alopátrica vicariante .....	56
5.3 Diversificação por alternâncias climáticas .....	57
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Evolução em ambientes subterrâneos

Os ecossistemas subterrâneos, com seu singular isolamento temporal e espacial, e comunidades biológicas relativamente simples, deslumbra evolucionistas por ser considerado um laboratório ecológico e evolutivo (Çetin, Turantepe & Gürbüz, 2021). Esse fascínio pela origem e evolução dos organismos cavernícolas perdura há mais de 250 anos, desde a descoberta da primeira espécie troglobia, *Proteus anguinus*, descrita por Laurenti, 1768. Isso porque os organismos cavernícolas apresentam uma série de especializações morfológicas, e.g. redução dos olhos e pigmentação do corpo e redução de asas, bem como fisiológicas e comportamentais (Culver & Pipan, 2009; Christiansen, 2012), que são frutos de processos biológicos lentos e contínuos em resposta ao isolamento nos ambientes subterrâneos (Jeffery, 2009). Essas adaptações frequentemente levam à redução da capacidade dispersiva, favorecendo o isolamento de linhagens e a especiação (Zhu *et. al*, 2022).

A especiação em faunas cavernícolas normalmente lembra padrões de faunas de outros habitats como o de ilhas. Todavia, as pesquisas com cavernas ainda não acompanham o crescente corpo das pesquisas em biogeografia de ilhas. Muitas vezes o grau de isolamento de várias cavernas e sistemas de cavernas uns dos outros não é claro, da mesma forma que a separação (ou não) de cavernas por barreiras ao fluxo gênico isso é de difícil compreensão (Barr & Holsinger *et al.*, 1985). Tal dificuldade foi demonstrada por Apostolopoulos (2022), em seu trabalho que analisou o rio Cumberland (afluente do rio Ohio) como barreira biogeográfica ao fluxo gênico em espécies crípticas de besouros de caverna do gênero *Darlingtonia*.

Todavia, as principais causas de isolamento em ambientes subterrâneos são relacionadas a eventos paleoclimáticos, tais como glaciações ocorridas no hemisfério Norte no Plioceno e Pleistoceno, (White & Pipan, 2019; Zhu *et al.*, 2022), bem como o estabelecimento de climas áridos em regiões tropicais como a Austrália (Humpreys, 2019).

No Brasil, o mosaico geobotânico resulta das expansões e retrações das florestas, cerrados e caatingas, provocadas pela alternância de climas úmidos e secos durante os períodos glaciais do Quaternário (Conti & Furlan, 2003). Há indícios de que a distribuição de florestas tropicais no Nordeste foi afetada por tais episódios, e sua expansão durante períodos úmidos abriu corredores entre a Amazônia e a Mata Atlântica que avançaram sobre a Caatinga (Wang *et. al*, 2004). Estudos de paleoclima indicam tais alternâncias climáticas no Nordeste desde meados do Pleistoceno até o presente (Wang *et. al*, 2004; Cruz *et. al*, 2009), sugerindo que o clima semiárido atual vem desde a transição do meio para o final do Holoceno, marcada por uma diminuição abrupta nas precipitações (Cruz *et. al*, 2009).

Assim, a distribuição das linhagens subterrâneas, principalmente em cavernas na Caatinga, pode estar relacionada a tais eventos climáticos, com dispersão em períodos mais úmidos e posterior isolamento de populações ancestrais no ambiente subterrâneo com o estabelecimento de climas mais secos. De fato, um padrão de estruturação populacional extremo, com possível complexo de espécies, foi identificado para a cigarrinha troglóbia *Kinnapotiguara troglobia* (Hoch & Ferreira 2013; Bento, 2021).

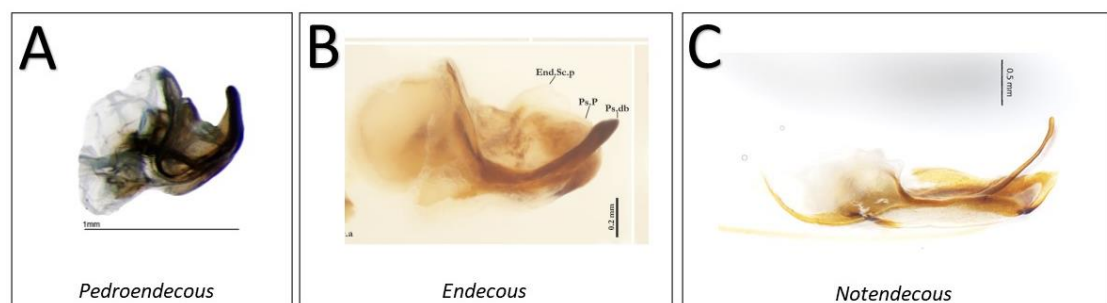
## 1.2 Conceito de Espécie

Embora a espécie seja umas das mais importantes unidades da biologia, defini-la e reconhecê-la é uma questão controversa (Mayr, 2005). De Queiroz (2007) propôs um conceito unificado de espécie tratando-as como linhagens de metapopulações que evoluem separadamente de outras linhagens. Neste trabalho, o autor fez uma distinção entre conceito e critério de espécies, indicando que o critério unificado que ele propunha continha a mesma ideia geral de outros conceitos. Para ele, a controvérsia sobre espécies reside não no conceito em si, mas no critério operacional para identificá-las. Assim, ele sugeriu que muitos dos antigos conceitos de espécie (eg. morfológico, ecológico, acústico etc.) na verdade estão centrados em critérios e não em conceitos de espécie.

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

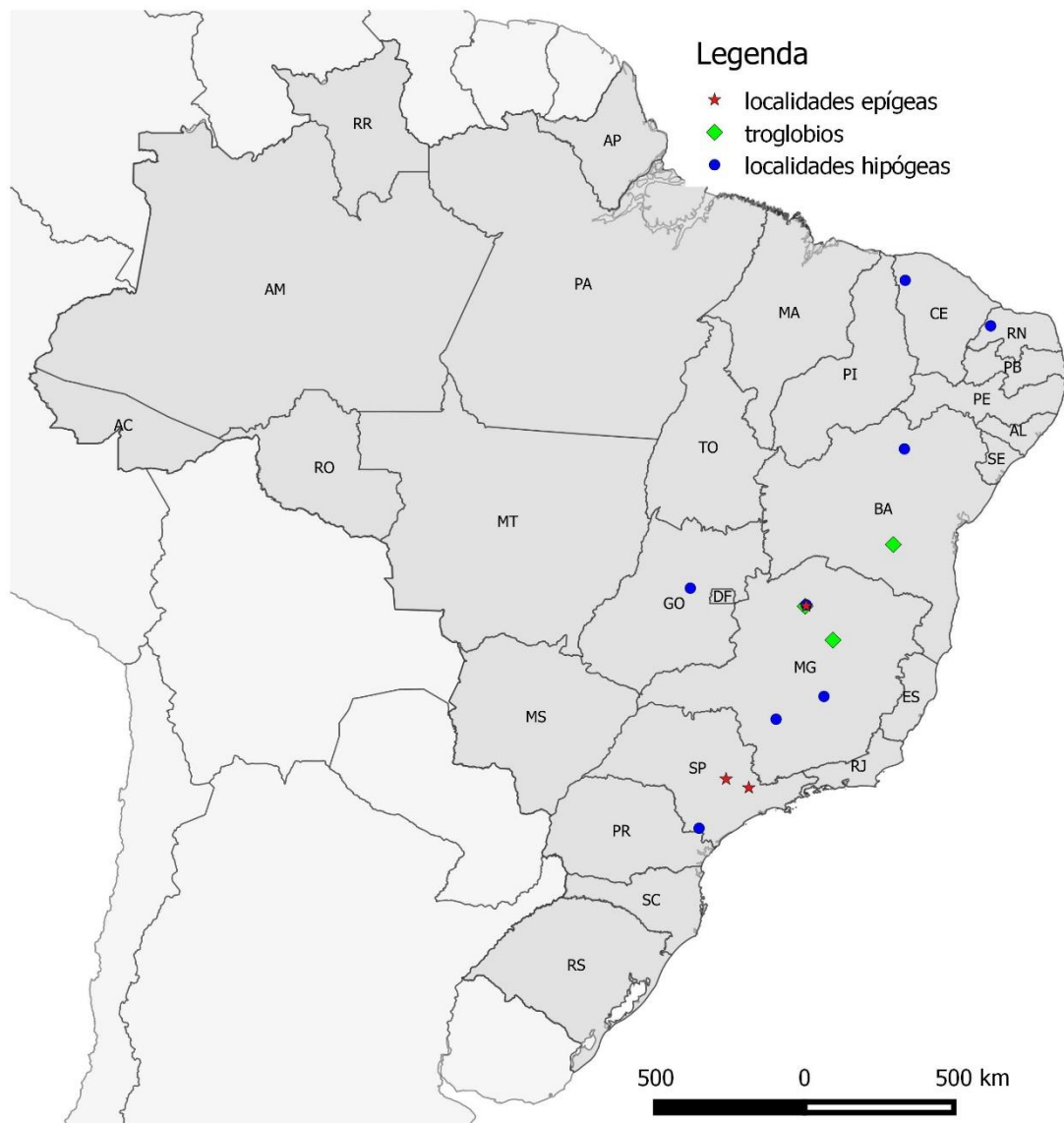
### 1.3 O gênero *Endecous* Saussure, 1878

O gênero *Endecous* foi proposto pelo naturalista Henri Louis Frédéric de Saussure em 1878, a partir da descrição da primeira espécie, *Endecous (Endecous) arachnopsis*. Gorochov (2014) dividiu o grupo em três subgêneros de acordo com a variação apresentada na genitália do macho (esclerito fállico) e a tégmina direita: *Endecous (Notendecous)*, *Endecous (Pedroecous)* e *Endecous (Endecous)*. *Endecous (Notendecous)* possui esclerito fállico mais alongado (formato retangular), *E. Pedroecous* tem um esclerito mais curto (formato de um quadrado achatado) e *E. Endecous* tem um esclerito padrão (formato quadrado), quando comparados em vista lateral (Figura 01) (Souza-Dias *et al.* 2014; Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2017; Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020;). Atualmente, existem 21 espécies descritas para o gênero e, destas, 15 estão ocorrem no Brasil (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020; Castro-Souza, Junta & Ferreira 2020). Estas são diferenciadas principalmente pela morfologia do complexo fállico, além do cariótipo e características bioacústicas (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020; Castro-Souza, Junta & Ferreira 2020).



**Figura 01.** Esclerito fállico de *Endecous* em vista lateral. A, *Endecous (Pedroecous) apterus*, imagem extraída de Souza-Dias *et al.* (2014). B, *Endecous (Endecous) painenesis* Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2020), imagem extraída de Castro-Souza *et al.* (2020). C, *Endecous (Notendecous) potiguar*, trabalho atual.

Das 15 espécies encontradas no Brasil, 11 possuem localidade-tipo em ambientes subterrâneos (Fig. 02) (*E. cavernicolus*, *E. peruassuensis*, *E. betariensis*, *E. alejomesai*, *E. ubajarensis*, *E. potiguar*, *E. apterus*, *E. bahiensis*, *E. painenesis*, *E. didymus* e *E. troglobius*). Destas, somente três são consideradas troglóbias. São estas *E. (P.) apterus* (Souza-Dias et al., 2014), *E. (E.) peruassuensis* (Bolfaniri & Bichuette, 2015) e *E. (E.) troglobius* (Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2020) (Figura 02).



**Figura 02.** Distribuição das 14 espécies do gênero *Endecous* ao longo do Brasil, de acordo com a localidade-tipo. *Endecous (Endecous) arachnopsis* Saussure, 1878 não possui sua localidade-tipo bem definida e por essa razão não foi representada no mapa. Losangos representam as espécies troglóbias.

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

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

## 2. OBJETIVOS

**2.1 OBJETIVO GERAL:** Avaliar se existem linhagens crípticas de *Endecous potiguar*, por meio de análises filogeográficas, bioacústicas e morfológicas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

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

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes utilizados neste estudo foram coletados em 22 cavernas calcárias que abrangem paraticamente toda a distribuição geográfica conhecida da espécie (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2017; Bento *et. al*, 2021) (Tabela 01). Tais cavernas estão inseridas na formação Jandaíra e estão localizadas nos municípios de Baraúna, Mossoró, Governador Dix-Sept Rosado, Felipe Guerra e Apodi, no Rio Grande do Norte, e em Quixeré, no Ceará (Tabela 01, Figura 01). Seis cavernas estão inseridas no Parque Nacional da Furna Feia (PNFF), unidade de conservação recém-criada para proteger uma importante concentração de cavernas entre os municípios de Baraúna e Mossoró (Figura 02) (Brasil, 2012).

Tabela 01. Dados das cavernas coletadas e informações do material que foi coletado para análise nesta dissertação. As abreviações significam: MOL – dados moleculares. MOR – dados morfológicos e ACUS – dados acústicos. \*O material analisado corresponde ao localidade-tipo de *Endecous potiguar*. \*\*Nova ocorrência registrada no presente estudo.

<b>Id</b>	<b>Localidade</b>	<b>Sigla</b>	<b>Município/Estado</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Longitude (W)</b>	<b>MOL</b>	<b>MOR</b>	<b>ACUS</b>
1	Gruta do Olho d'Água do Cedro	ODC**	Quixeré/CE	05° 12' 39,69"	37° 43' 35,87"	X	X	X
2	Furna Nova	FNV	Baraúna/RN	05° 02' 03,21"	37° 34' 16,04"	X	X	X
3	Furna Feia	FNF	Baraúna/RN	05° 02' 12,76"	37° 33' 36,64"	X		X
4	Pedra Lisa	PDL**	Baraúna/RN	05° 02' 43,84"	37° 31' 18,85"	X		X
5	Roncador	RON	Apodi/RN	05° 35' 51,87"	37° 49' 40,59"	X		
6	Três Lagos	TLG	Felipe Guerra/RN	05° 35' 34,40"	37° 41' 12,70"	X		
7	Urubu	URU	Apodi/RN	05° 35' 18,09"	37° 49' 46,61"	X		
8	Crotes	CRO	Felipe Guerra/RN	05°33' 38,77"	37° 39' 31,54"	X		X
9	Carrapateira*	CAR	Felipe Guerra/RN	05° 33' 38,22"	37° 39' 50,32"	X	X	
10	Trinta	CTA	Mossoró/RN	05° 12' 44,36"	37° 15' 50,95"	X	X	X
11	Capoeira de João Carlos	CJC	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05° 30' 56,69"	37° 31' 41,75"	X	X	X
12	Abissal	ABI	Felipe Guerra/RN	05° 33' 51,06"	37° 39' 57,29"			
13	Arapuá	ARA	Felipe Guerra/RN	05° 31' 48,25"	37° 36' 58,47"	X		
14	Catedral	CAT	Felipe Guerra/RN	05° 33' 50,49"	37° 39' 57,37"			
15	Pau	PAU	Felipe Guerra/RN	05° 33' 45,43"	37° 37' 15,92"			
16	Rainha	RAI	Felipe Guerra/RN	05° 34' 41,64"	37° 38' 35,64"			
17	Trapiá	TRA	Felipe Guerra/RN	05° 33' 45,43"	37° 37' 15,92"			
18	Boniteza	BON	Governador Dix-Sept Rosado/RN	05°30' 51,02"	37° 33' 21,54"			
19	Marimbondo/Clara Água	MAR	Governador Dix-Sept Rosado/RN	05° 29' 44,11"	37° 32' 42,24"			
20	Buraco da Nega	BNC	Apodi/RN	05° 31' 57,16"	37° 50' 40,73"			
21	Beira-rio	BRC	Felipe Guerra/RN	05°33'07.39"	37°37'42.91"			
22	Buraco Redondo	BRD	Felipe Guerra/RN	05°34'42.98"	37°39'04.99"			

23	Cote	COC	Felipe Guerra/RN	05°31'34.76"	37°34'27.27"			
24	Lapa I/ Engano	LAP	Felipe Guerra/RN	05°33'41.89"	37°41'42.25"			
25	Rumana	RUM	Felipe Guerra/RN	05°33'54.25"	37°39'07.13"			
26	Seta	SET	Felipe Guerra/RN	05°32'40.23"	37°39'07.13"			
27	Boca de Peixe	BPX	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05°29'04.45"	37°33'29.62"	X		
28	Lajedo Grande	LJG	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05°27'44.20"	37°33'09.06"			
29	Britador	BRI	Baraúna/RN	05°01'25.85"	37°29'49.51"			
30	Cipós	CIP	Baraúna/RN	05°01'58.99"	37°29'57.51"			
31	Escada	ESC	Baraúna/RN	05°10'07.83"	37°43'40.98"			
32	Lago	LAG	Baraúna/RN	05°02'11.40"	37°34'15.24"			
33	Macacos/Esquecida	MAC	Baraúna/RN	05°02'19.80"	37°33'41.30"			
34	Pinga	PIN	Baraúna/RN	05°03'08.06"	37°32'22.97"	X		
35	Bota	BOT	Felipe Guerra/RN	05°31'30.85"	37°37'05.29"			
36	Complexo Suíço	COM	Felipe Guerra/RN	05°33'42.50"	37°39'38.70"			
37	Chocalho	CHO	Felipe Guerra/RN	05°33'36.77"	37°39'39.36"			
38	Descoberta	DES	Felipe Guerra/RN	05°33'47.68"	37°39'55.50"			
39	Geilson	GEI	Felipe Guerra/RN	05°35'53.23"	37°41'17.56"			
40	Sabonete	SAB	Felipe Guerra/RN	05°31'36.05"	37°37'26.31"			
41	Troglobios	TRO	Felipe Guerra/RN	05°33'24.27"	37°39'40.57"			
42	Vale	VAL	Felipe Guerra/RN	05°31'50.97"	37°36'58.02"			
43	Poço Feio	PFE	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05° 29' 15.51"	37° 33' 33.40"	X		
44	Que já foram	QJF	Felipe Guerra/RN	05° 32' 47.68"	37° 39' 59.78"	X		
45	Boa	BOA	Felipe Guerra/RN	05o 33' 59,50"	37o 41' 52,43"	X		
46	Teto Baixo	CTB	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05 29' 40,52395"	37 32' 41,22753'	X		

47	Zé de Juvino	ZJU	Gov. Dix-Sept Rosado/RN	05° 11' 57.79"	37° 46' 39.77"	X		
48	Dois bodes	BOD	Baraúna/RN	05°11' 57.79"	37° 46' 39.77"	X		

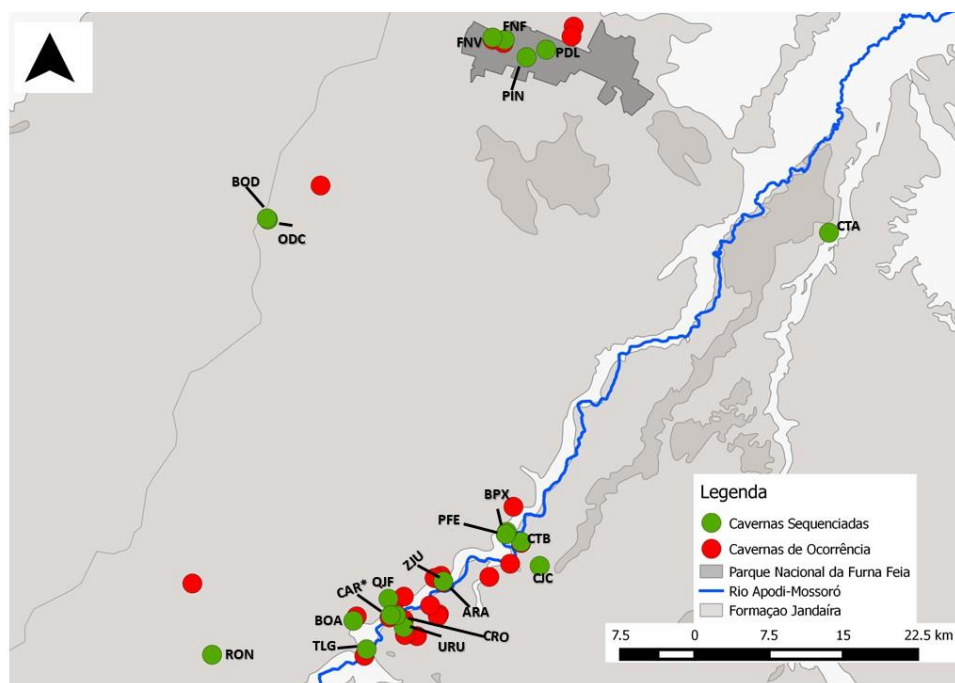


Figura 03: Localização das cavernas com registros de ocorrência de *Endecous potiguar*. Em verde as cavernas com indivíduos sequenciados no atual trabalho e em vermelho as que não foram sequenciadas, mas possuem ocorrência.

A região está inserida no Bioma Caatinga, cuja vegetação é formada por um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas e enclaves úmidos que cobrem a maior parte da região Nordeste, ocupando uma área aproximada de 734.478 km<sup>2</sup> (Silva *et al.*, 2018). De acordo com a Portaria N° 463/2018 do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2018), parte da área dos municípios de Felipe Guerra e Gov. Dix-Sept Rosado é considerada de importância biológica muito alta e prioritária para a conservação do bioma Caatinga. Além disso, são consideradas também Áreas

Prioritárias para Conservação do Patrimônio Espeleológico Brasileiro (ICMBio/Cecav, 2018).

A classificação do clima, conforme Köppen (1884), indica predominância do tipo BSh (61.2%), caracterizado por clima semiárido com pluviosidade anual inferior a 650 mm (Álvares *et al.*, 2013). As precipitações são irregulares e significativas, ocorrendo no período de fevereiro a julho e concentrando-se de março a junho. A umidade relativa é bastante variável, geralmente entre 59 e 76%, e a temperatura média anual em torno de 28° C. (Silva *et al.* 2018)

As cavernas de Felipe Guerra/RN, Mossoró/RN, Gov. Dix-Sept Rosado/RN e algumas em Baraúna/RN (ODC e BOD) estão na Bacia Hidrográfica do Rio Apodi-Mossoró. Já as cavernas localizadas no PNFF estão inseridas na Faixa Litorânea Norte de Escoamento Difuso (microbacias costeiras). (Cruz *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012). (Tabela 01, Figura 03).

### **3.2 COLETA DOS ESPÉCIMES DE *Endecous potiguar***

Os indivíduos foram coletados manualmente por meio de busca ativa, fixados em etanol absoluto (99,5% P.A) e armazenados sob refrigeração (-20°C).

### **3.3 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA**

As etapas de extração, amplificação, PCR e sequenciamento foram realizadas no Instituto Tecnológico Vale-Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS). A primeira etapa (extração) baseou-se na extração do DNA total de *E. potiguar* utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), conforme orientações do fabricante. Na segunda etapa (amplificação), foram obtidas sequências parciais do marcador mitocondrial citocromo C oxidase subunidade I (cox1), posteriormente amplificadas por reação em

cadeia da polimerase (PCR) com os primers LCO-1490 (forward) e HCO-2198 (reverse) (Folmer *et al.* 1994). Para as reações de PCR, foram utilizados volumes de 25µl contendo 5 µl de tampão 5x GoTaq Reaction (Promega), 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl de dNTP (2mM), 2 µl de DMSO, 0,5 µl de cada primer (10mM), 0,2 µl da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 4 µl de DNA genômico total. As etapas de termociclagem consistiram em 1 ciclo de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 48°C, 1 minuto a 72°C; e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Em seguida, todos os produtos de PCR foram previamente visualizados em gel de agarose 1,2%, purificados e posteriormente utilizados em uma reação de PCR para sequenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems).

A última etapa (sequenciamento) consistiu de reações, em ambos os sentidos, com volumes de reação de 10 µl contendo 0,5 µl de BigDye 2,5, 2 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems), 2 µl dos produtos de PCR e 0,5 µl de primer. As etapas de termociclagem foram: um ciclo de 1 minuto a 96°C, 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após a amplificação, os produtos de PCR foram novamente purificados por EDTA/Acetato de sódio/etanol e analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3730-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **3.4 ANÁLISE DE DADOS MOLECULARES**

Após o sequenciamento, as sequências consenso foram montadas com uso do Geneious Prime (versão?) e alinhadas usando ClustalW (Thompson *et al.* 1994), implementado no programa Mega 7.0 (Kumar *et al.* 2016), seguidas por inspeção visual para ajustes finais. Distâncias genéticas foram estimadas usando o MEGA 7.0.

A partir de análise de distribuição de haplótipos, realizada com o programa DNAsp v.5 (Librado & Rozas 2009), foram construídas redes de haplótipos no PopArt (versão?) (Leigh & Bryant 2015).

Nas análises filogenéticas foram selecionados apenas haplótipos únicos, exceto quando compartilhado entre diferentes localidades (com o objetivo de manter a informação da distribuição geográfica). O modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado pelo bModelTest no software Beast 2 (Bouckaert et al, 2019). Utilizando o modelo evolutivo selecionado, foram realizadas Inferências Bayesianas (IB) no Beast 2 (Bouckaert *et al*, 2019). Concomitantemente, foram realizadas reconstruções filogenéticas de Máxima Verossimilhança (MV) (usando GTR GAMMA I de acordo com a análise prévia no bmodelTest) usando o RAxML 8 (Stamatakis, 2014) implementado no *Genious Prime*. Sequências de *Endecous (Endecous) ubajarensis Zefa, 2014* foram usadas como grupo externo.

IB e as análises de tempo de divergência foram realizadas usando a opção “*Relaxed Clock Log Normal*”, após o Teste de Razão de Verossimilhança, realizado no *DAMBE7* (Xia, 2018), descartar a hipótese de relógio molecular estrito para todos os táxons. A taxa de mutação utilizada foi de 1,6%substituições?/ma. Essa taxa foi obtida em espécies de grilos de cavernas do gênero *Dolichopoda* (Orthoptera, Rhaphidophoridae) (Allegrucci *et al.*, 2011).

O prior escolhido foi o *Coalescent Constant Population* e foram feitas quatro corridas independentes com MCMC de  $100 \times 10^6$  gerações e amostragem a cada 5000 gerações. A convergência das corridas foi verificada no *Tracer* v1.7 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) com valores de ESS superiores a 200. Em seguida, foi executado o *LogCombiner* para juntar os quatro arquivos de log e quatro arquivos de árvores (.trees). A topologia de consenso e valores de probabilidades posteriores

foram obtidas no programa *TreeAnnotator* (aplicando *burn-in* de 15%), em seguida a edição gráfica foi realizada no *FigTree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Para identificar unidades taxonômicas operacionais (UTOs, sendo interpretadas aqui como possíveis espécies), foram utilizadas três análises de delimitação de linhagens. A primeira utilizada foi o ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery, Puillandre *et al*, 2012) com o intuito de fazer uma análise exploratória por método de distância através do cálculo das diferenças entre distâncias (maior distância intraespecífica e a menor distância interespecífica). As Análises foram realizadas no servidor ABGD web (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>), usando a opção K80, priors intraespecíficos variando de 0.001 a 0.25 em 10 steps, além de relative gap width (X) de 1.5.

Já os demais métodos baseiam-se em cálculos a partir da análise das árvores de IB e MV. Foram feitos o GMYC e PTP. As análises bayesianas de delimitação de linhagens são baseadas em árvores filogenéticas que incorporam modelos populacionais, como o da teoria da coalescência, buscando estabelecer o ponto de transição entre os processos populacionais e especiação. O GMYC, que utiliza análises de delimitação bayesianas, modela especiações ou eventos de ramificação com base no tempo de divergência. Já as análises de MV para delimitação de linhagens se baseiam na utilização de uma árvore de verossimilhança para calcular o ponto de transição entre processos populacionais e de especiação. O PTP utilizou essa lógica para fazer tal cálculo com base na acumulação de substituições entre sequências. Sendo assim, com base nas árvores geradas na análise de inferência Bayesiana, conforme mencionado anteriormente, os métodos GMYC

(<https://species.h-its.org/gmyc/>) e PTP (<https://species.h-its.org/ptp/>) foram executados no servidor “Species delimitation server” (<https://species.h-its.org/>).

Em análises só com genes mitocondriais, Bassitta *et. al* 2020 sugere a utilização de análises de estruturação populacional utilizando o algoritmo implementado no BAPS 5.2 (*Bayesian Analysis of Population Structure*) para substituir o algoritmo desenvolvido para analisar dados *multilocus* Bayesian *Phylogenetics and Phylogeography* (BPP). O BAPS seguiu comandos da opção *Population mixture analysis – Clustering with linked loci* (Corander e Tang, 2007; Corander et al., 2008) e foram rodadas 10 corridas independentes para cada cenário de  $K=2:n$  (onde  $n$  é o número de localidades).

As análises demográficas e diversidade genética foram feitas utilizando o *software Arlequin* 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) para calcular o índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ), como uma estimativa de fluxo gênico, entre todas as localidades de cada um dos táxons. Também com o uso do Arlequin 3.5 foram realizados testes de neutralidade, usando *D de Tajima* (Tajima, 1989) e *Fs de Fu* (Fu, 1997), e calculados os índices de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $h$ ).

A reconstrução filogenética e centro de origem foi estimada através do modelo *Homogeneous Brownian Diffusion*, implementado pelo programa BEAST (Lemey *et al.*, 2010). Foram usadas as sequências nucleotídicas e as coordenadas geográficas das amostras (inseridas no programa como *traits*). A análise utiliza inferência bayesiana para fazer a reconstrução dos caracteres contínuos ancestrais à medida em que estima também a localização geográfica dos nós internos em cada genealogia. Cada árvore gerada foi aberta no programa SPREAD 1.0.4 (Bielejec *et al.*, 2011), que cria um arquivo em formato *keyhole markup language* (.kml) contendo a história filogeográfica do gene. O arquivo .kml pode ser aberto no Google Earth e

visualizado na forma de animação, que exibe o surgimento gradual de polígonos (baseados em 80% de alta densidade posterior), representando a área onde possivelmente se originou cada nó da árvore filogenética. A ordem em que surgem os polígonos sugere as possíveis rotas de colonização daquela linhagem, bem como o seu tempo.

### 3.5 DADOS MORFOLÓGICOS

Para análise dos dados morfológicos, foram selecionados sete indivíduos machos adultos de localidades distintas de acordo com os resultados preliminares das análises moleculares. Em seguida, os indivíduos tiveram seu esclerito fálico (genitália do macho) dissecado, seguindo o protocolo utilizado por Castro-Souza *et al.* (2017). Três destes indivíduos são do lado esquerdo do rio Apodi-Mossoró, correspondentes as cavernas CJC, CTA e URU (Tabela 01) e quatro (RON, FNV, CAR) do lado direito, um deles corresponde ao parátipo (ISLA 21035, Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2017).

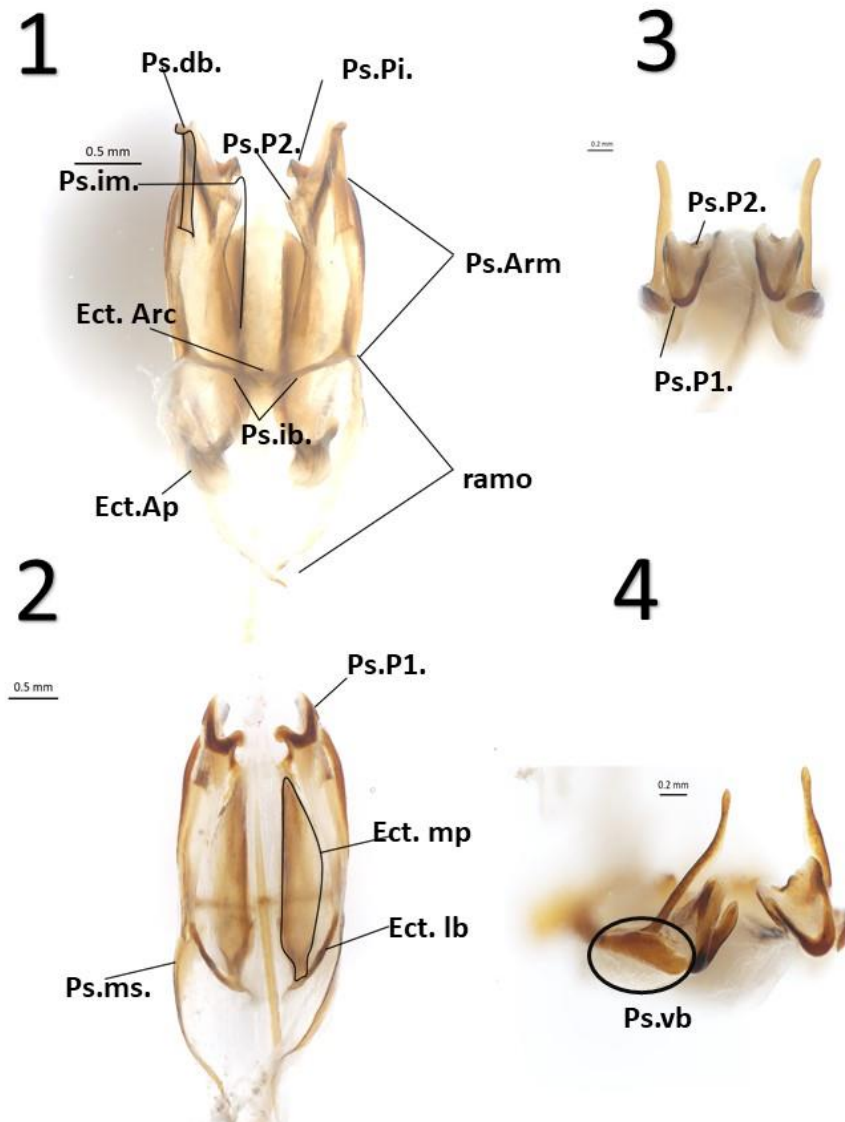
A morfologia da genitália foi analisada em estereomicroscópio Stemi 2000 (ZEISS). As medidas e as fotografias foram obtidas em *estereomicroscópio Axion Zoom V16* (ZEISS). Os caracteres morfológicos analisados neste trabalho seguiram o artigo de descrição proposto por Castro-Souza *et al.* (2017).

Deste modo, foram feitas comparações morfológicas descritivas entre as genitálias, utilizando a terminologia proposta por Desutter (1987, 1988), e modificada de Desutter-Grandcolas (2003). O esclerito fálico foi analisado em estereomicroscópio *Stemi 2000* (ZEISS), e para obtenção de fotografias foi utilizado o estereomicroscópio *Axion Zoom V16* (ZEISS).

*Abreviações:* **Ps.Arm** = braço do esclerito pseudepifálico. **Ps.db** = ramo dorsal do esclerito pseudepifálico. **Ps.im** = projeção interior do esclerito pseudepifálico.

**Ps.ib** = barras interiores do esclerito pseudoepifálico. **Ps.ms** = escudo membranoso do esclerito pseudoepifálico. **Ps.vb** = ramo ventral do esclerito pseudopifálico. **Ps.P1**

=



parâmero 1 pseudopifálico. **Ps.P2** = parâmero 2 pseudopifálico. **Ps.Pi** = projeção interior do parâmero pseudoepifálico. **r.** = ramo. **Ect.Arc** = arco ectofálico. **Ect.mp** = projeção mediana do esclerito ectofálico. **Ect.lb** = barras laterais do esclerito ectofálico. **Ect.Ap** = apódema do ectofálo (Figura 02).

**Figura 04.** *Endecous (Notendecous) potiguar*, esclerito fálico do parátipo (ISLA 21058) utilizado por Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2017). 1- Vista dorsal. 2- Vista ventral. 3- Vista frontal. 4- Vista diagonal. Convenções Seguindo Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2017): **Ps.Arm** = braço do esclerito pseudoepifálico; **Ps.db** = ramo dorsal do esclerito pseudoepifálico; **Ps.im** = projeção interior do

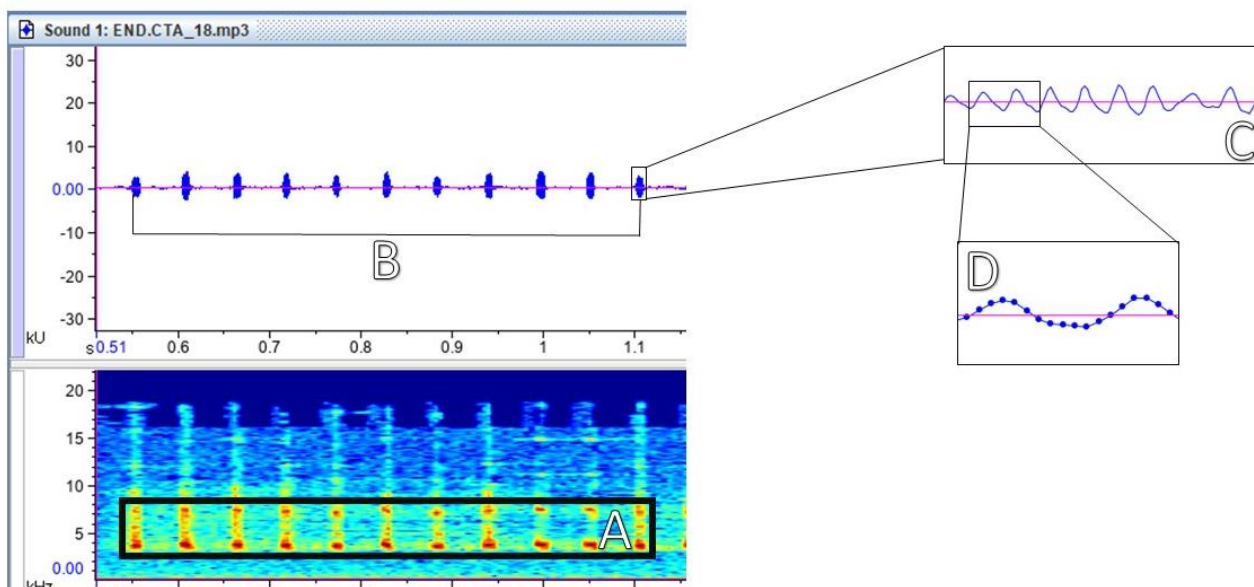
esclerito pseudopifálico; **Ps.ib** = barras interiores do esclerito pseudopifálico; **Ps.ms** = escudo membranoso do esclerito pseudopifálico; **Ps.vb** = ramo ventral do esclerito pseudopifálico; **Ps.P1** = parâmero 1 pseudopifálico; **Ps.P2** = parâmero 2 pseudopifálico; **Ps.Pi** = projeção interior do parâmero pseudopifálico; **r.** = ramo; **Ect.Arc** = arco ectofálico; **Ect.mp** = projeção mediana do esclerito ectofálico; **Ect.lb** = barras laterais do esclerito ectofálico; **Ect.Ap** = apódema do ectofálo,

### 3.6 – DADOS BIOACÚSTICOS

Os indivíduos analisados foram coletados nas cavernas, e posteriormente levados a local que permitiu a gravação em ambiente controlado, sendo colocados em uma caixa com almofadas acústicas para melhor abafar o som. Na caixa eram colocados machos e fêmeas adultos, sendo realizadas gravações com o auxílio de um microfone de lapela que foi colocado a cerca de 10 a 20 cm dos espécimes (Figura 05). Após 12 horas, foi medida a temperatura ambiente com um termômetro INCOTERM. Quatro parâmetros relacionados ao som foram avaliados para cada indivíduo com base nas gravações: frequência máxima do pico (*peakfreq*) (Figura 6A), duração da frase (*frasedur*) (Figura 06B) pulso por nota (*pulsespernote*) (Figura 6C), intervalo de cada pulso (*interpursedur*) (Figura 06D). As análises bioacústicas foram feitas com os auxílios dos softwares Audacity® e RavenPro 1.6.3 (versões disponíveis em [www.audacityteam.org](http://www.audacityteam.org); [www.ravensoundsoftware.com](http://www.ravensoundsoftware.com)). Como o som do grilo é feito por estridulação, foram medidas e contadas as seguintes variáveis morfométricas: comprimento da asa (*wingc*), largura da asa (*wingl*) e quantidade de dentes (*teeth*), a fim de analisar junto com as variáveis acústicas.



**Figura 05.** Demonstração didática de como ocorreram as gravações acústicas dos espécimes coletados.



**Figura 06.** Parâmetros acústicos analisados no software RavenPro 1.6.3

Para discriminar acústica e morfologicamente, as linhagens genéticas foram organizadas entre margens opostas do rio Apodi-Mossoró. Para identificar quais variáveis mais contribuíram para sua separação, usou-se uma abordagem de aprendizado de máquina baseada em uma floresta aleatória (*Random Forest*) de árvores de decisão (Breiman, 2001), empregando variáveis bioacústicas, bem como medidas morfométricas (largura/comprimento da asa e número de dentes) correlacionadas à emissão dos sinais acústicos. Nesta análise foram utilizados oito indivíduos coletados em cavernas lado direito e quatro do lado esquerdo do rio. O algoritmo de Random Forest, implementado no pacote R *randomForest* (Liaw & Wiener, 2002), gera árvores de classificação aleatórias usando amostras de *bootstrap* do conjunto de dados original para fabricar árvores de classificação não-podadas (geralmente 1000).

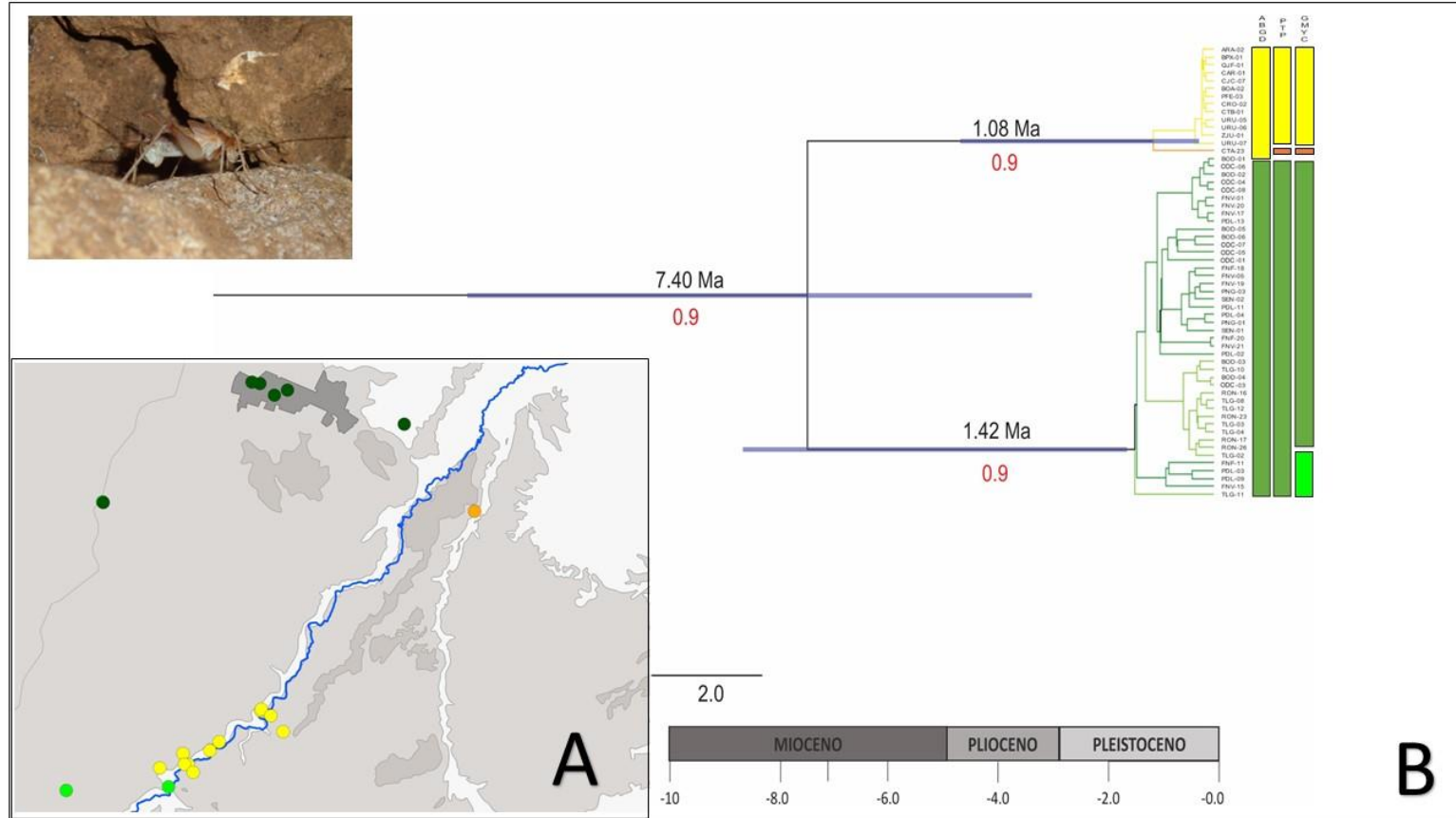
Em seguida, essas árvores são usadas para gerar classificadores, escolhendo as melhores divisões com base em uma amostra aleatória de preditores. Por fim, o algoritmo usa esses preditores agregados para classificar novos dados com base em critérios de regra de maioria. Em cada etapa do *bootstrap*, ele prevê os dados não presentes na amostra *bootstrap* (amostras "out of the bag", ou OOB) e agrega esses resultados no final para gerar uma estimativa de erro da classificação (para mais detalhes, consulte Liaw & Wiener, 2002). A análise também gera uma medida de importância para cada variável, e uma medida da estrutura interna dos dados. A importância da variável é estimada com base no efeito de permutar uma variável, deixando outras inalteradas no erro de previsão.

#### **4. RESULTADOS**

Foram obtidas 151 sequências parciais do gene mitocondrial *cox-1* com 571 pb para 21 localidades diferentes (Tabela 01). O presente trabalho também registrou novas ocorrências e ampliou a área de distribuição do táxon estudado (Figura 03, Tabela 01). Foram identificados 36 haplótipos nas 21 cavernas (Figura 09).

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

Com altos valores de probabilidades posteriores, a IB apontou dois clados para o táxon. Todavia, essa divisão não teve suporte na MV, que separou os táxons em três clados, e nem em dois dos três métodos de delimitação de linhagens. Isso corrobora duas possíveis linhagens (Tabela 02). De acordo com a IB, essa bifurcação foi datada em cerca de aproximadamente 7.40 Ma (95% HPD 13.80-3.75 Ma) (Figura 07).

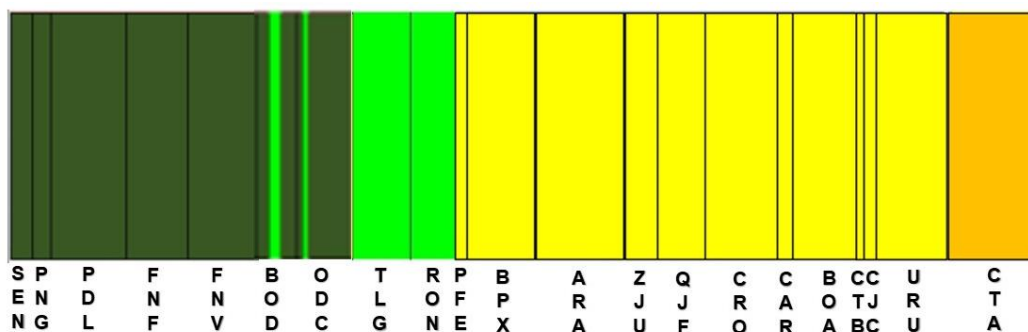


**Figura 07:** Representação das cavernas analisadas para estudos moleculares (A). Árvore filogenética de consenso resultantes da inferência bayesiana com relógio molecular (B). Em cada nó da árvore são representados os valores de probabilidade posterior (abaixo) e a idade média estimada (acima). As barras roxas representam os intervalos com 95% HPD para as idades estimadas. Para fins de representação, o grupo externo foi retirado.

## 4.2 Estruturação populacional

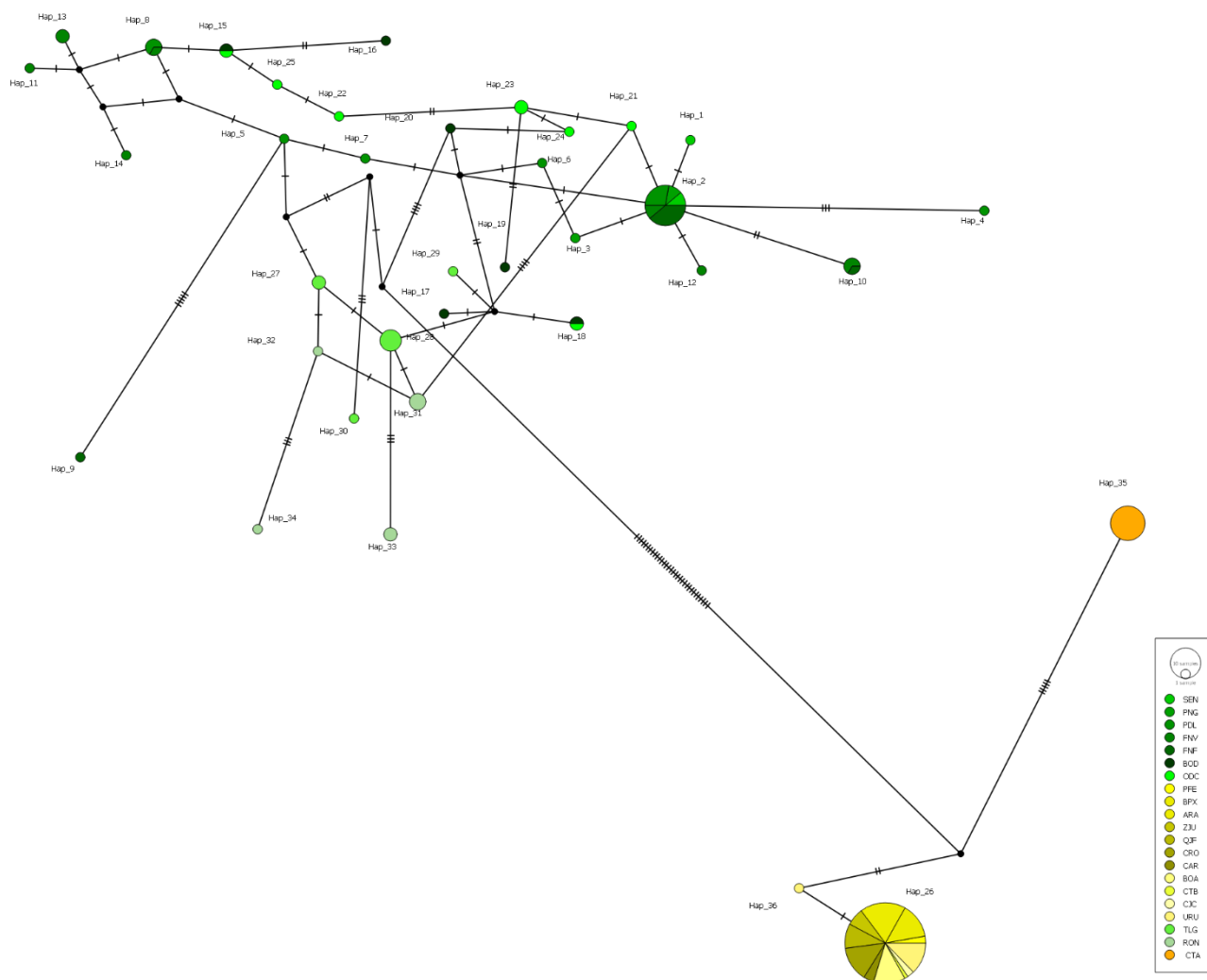
A inferência bayesiana de estrutura genética de populações implementada pelo BAPS 5.2 indicou 4 agrupamentos populacionais (Figura 08) ( $\log(mv) = -981.13$ ). O agrupamento em verde escuro corresponde em sua maioria às linhagens do Parque Nacional da Furna Feia, além das localidades do SEN, BOD e ODC (POP 1). As duas últimas correspondem a cavernas do mesmo lajedo e geograficamente muito próximas que, por sua vez, também possuem indivíduos de linhagens da população verde neon que correspondem em sua maioria às cavernas RON e TLG (POP 2). A outra população, indicada pela cor amarela, corresponde às cavernas que estão próximas às margens do Rio Apodi-Mossoró (POP 3). A quarta população (POP 4), que está geograficamente mais distante das demais, é representada pela cor laranja e contempla a caverna CTA.

Dos 36 haplótipos observados, foram registrados seis compartilhamentos entre localidades próximas, três desses compartilhamentos (Hap\_8, Hap\_10 e Hap\_2) são entre haplótipos do Parque Nacional da Furna Feia, dois são entre cavernas do mesmo lajedo (Hap\_15 e Hap\_18) e o Hap\_26 contempla o maior compartilhamento observado, com ocorrência em 11 cavernas pertencentes à linhagem amarela (um indicativo de um possível haplótipo ancestral) (Figura 09).



**Figura 08:** Atribuição de indivíduos realizada pelo BAPS, sugerindo quatro populações para

*E. potiguar*.



**Figura 09:** Rede de haplótipos do gene *cox-1*. As marcas de hachura entre os pontos pretos representam os passos mutacionais, a área do círculo dos haplótipos é proporcional ao número de indivíduos. As cores identificam as diferentes localidades.

### 4.3 Distâncias genéticas

Os resultados do BAPS sugerem quatro populações (Figura 08). Outrossim, a árvore bayesiana (Figura 07) e as distâncias genéticas analisadas sugerem duas linhagens, sendo uma nova. A distância genética entre as duas linhagens é de quase 8%, uma correspondendo a *E. potiguar* e a outra a uma provável nova espécie. Sendo assim, sugere-se que a linhagem *E. potiguar* seja aquela que contempla sua localidade-tipo e a nova linhagem seja a que não contemple.

Tabela 02. Distâncias genéticas médias (K2P) intraespecíficas (na diagonal, em negrito) entre as diferentes linhagens identificadas.

	<b>1</b>	<b>2</b>
<b><i>Endecous_sp</i> (SEN, PNG, PDL, FNF, FNV, BOD, ODC, TLG e RON )</b>	0,004%	
<b><i>Endecous potiguar</i> (PFE, BPX, ARA, ZJU, QJF, CRO, CAR, BOA, CTB, CJC, URU e CTA)</b>	<b>7,99%</b>	0,009%

#### 4.4 Análise demográfica e diversidade genética

Os testes de neutralidade apontam para uma expansão populacional nas populações 1, 2 e 3. Embora o p não seja significativo para esta análise, quando analisamos esse teste junto à rede de haplótipos (Figura 09) observamos estes mesmos indícios de expansão populacional. Como a população 4 contém um único haplótipo, não há variação e isso justifica o valor 0 (Tabela 3).

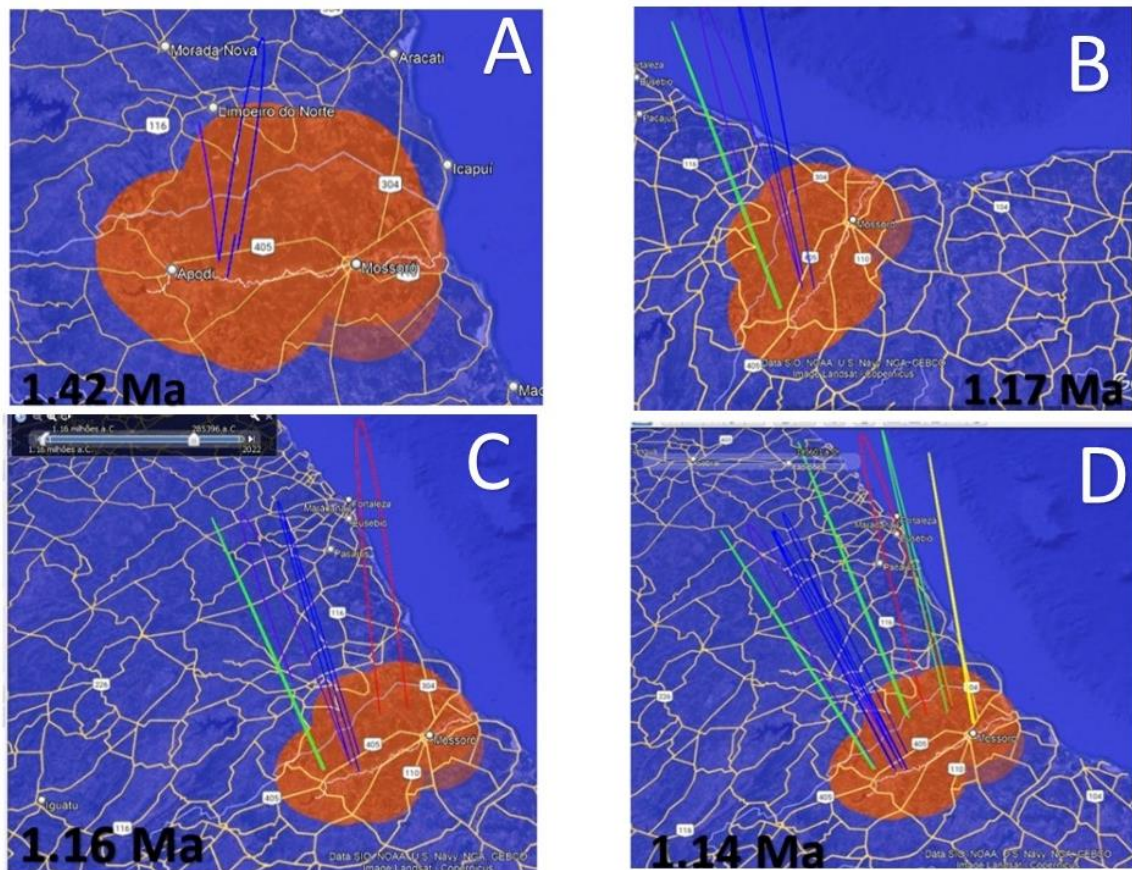
As populações que apresentaram maiores diversidades haplotípica (h) foram a populações 1 (0.856) e 2 (0.906). A população 3 apresentou uma baixa diversidade haplotípica (0.028) e a população 4 não teve variação alguma. Já a diversidade nucleotídica ( $\pi * 100$ ) variou de 0.0624 (POP 1) a 0.000 (POP4). A falta de variação na população 4 corresponde ao fato dela representar somente um haplótipo único de uma caverna específica (CTA).

**Tabela 03** Índices de diversidade populacional e estatísticas de testes de neutralidades para o Cox1 dos espécimes analisados. Número de sequências (N), número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Abreviações de localidade de acordo com a Tabela 1; Populações de acordo com os resultados do BAPS apresentados na figura 06. \* P < 0.05.

POP	Índices de diversidade populacional					Teste de Equilíbrio			
	N	H	S	h	$\pi * 100$	Fs de Fu	p	D de Tajima	p
1	48	24	27	0,856	0,624	-14,35143	0.00	-1,37463	0,68
2	19	10	15	0,906	0,535	-2,88583	0.06	-1,07939	0,15
3	72	2	1	0,028	0,005	-1,94204	0.02	-1,06426	0,13
4	13	1	0	0,000	0,000	0,00000	N.A.	0,00000	1,00

#### 4.5 Reconstrução filogeográfica e centro de origem

As análises de centro de origem indicam que o ancestral comum mais antigo da linhagem surgiu provavelmente próximo a Apodi (POP 2) a 1,42 Ma (Figura 10A). A segunda linhagem (POP 3) surgiu há aproximadamente 1,17 Ma (Figura 10B). A terceira linhagem (POP1) surgiu há aproximadamente 1,16 Ma (Figura 10C) e a última linhagem (POP 4) surgiu há 1.14 Ma (Figura 10D). O relógio molecular da IB estima que as linhagens 1 e 2 divergiram há aproximadamente 1,42 Ma (95% HPD 8,70-1,40 Ma) (Figura 09). Já para as linhagens 3 e 4 sugere uma divergência de aproximadamente 1,08 Ma (95% HPD 5,30-0,20 Ma). Ambas estão na margem do que foi estimado nesta reconstrução filogeográfica.



**Figura 10:** Dinâmica espacial do grilo *Endecous potiguar* projetada no Google Earth, reconstruída a partir dos estados de localização da árvore MCC. Em A é representado o primeiro centro de origem datada em milhões de anos. Em B a segunda diversificação, em C a terceira e em D a última. As imagens foram retiradas do software Google Earth.

#### 4.6 Distinções Morfológicas

Através da análise de 14 variáveis nas imagens do esclerito fálico, identificamos em somente duas delas diferenças sutis na morfologia (Tabela 04). Essas diferenças não corresponderam aos agrupamentos populacionais visto nas análises moleculares, sugerindo uma diversidade críptica nas linhagens de *E. potiguar*. As diferenças encontradas podem ainda ser devido às variações intraespecíficas ou posicionamento da genitália no momento da foto, sugerindo uma ampla conservação morfológica dos espécimes. Ademais, percebe-se que a

morfologia do esclerito fállico conserva padrões do holótipo descrito por Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2017).

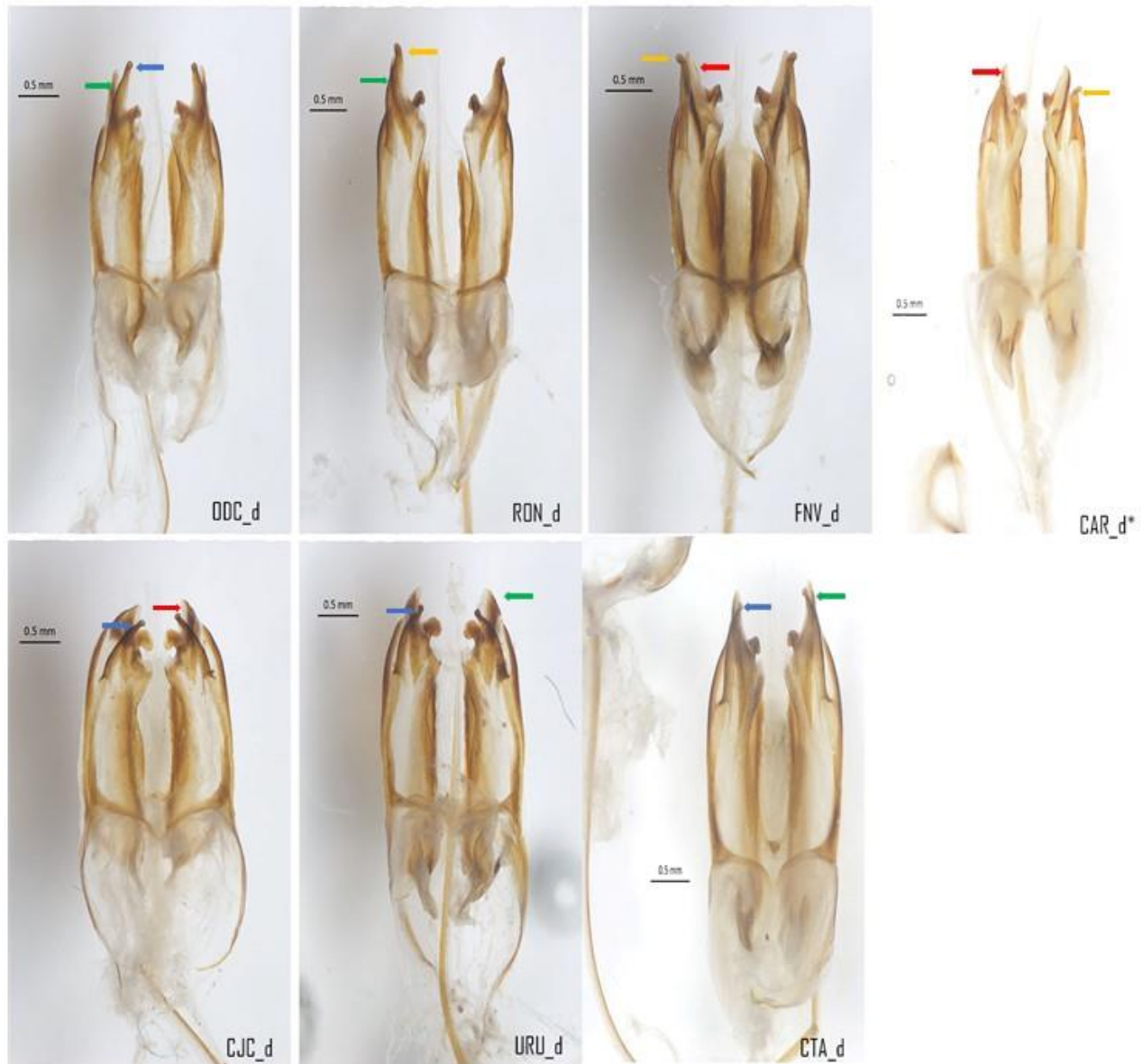
#### **4.6.1) Ps.arm – Braço do esclerito pseudepifállico**

É toda ramificação do esclerito fállico sem as projeções apicais normalmente apontada na parte lateral (Figura 11). Dentro de *Endecous* (*Notendecous*), essa estrutura sempre é alongada (muito discrepante quando comparado com os subgêneros *Endeocus* (*Endecous*) e *Endecous*. (*Pedroecous*) (Figura 01). Dentro da nossa análise, observamos dois padrões: linear e curvado. Os indivíduos que apresentam o padrão linear são ODC, RON, URU e CTA conforme observado na Figura 11 (setas vermelho e verde), e os que pertencem ao padrão curvado são CAR, FNV e CJC. Essa diferença morfológica não ocorre separando os dois clados que as análises moleculares sugeriram.

#### **4.6.2) Ps.db – Ramo dorsal do esclerito pseudepifállico**

É uma projeção fina que apresenta uma dobra na ponta (similar a uma esfera), em alguns casos essa projeção (o ramo da estrutura) é ligeiramente curvada para fora (material tipo, Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017) ou ligeiramente curvada para dentro do esclerito como observado nos materiais analisados (setas azuis e laranja na Figura 09). Como observado na Figura 11, os indivíduos CJC, URU e CTA apresentam o mesmo padrão de curvatura, compartilhando também com o ODC. Já os espécimes das cavernas FNV e RON seguem a orientação do parátipo CAR. Esse padrão de morfologia é o que mais se aproximou do padrão molecular (Tabela 03).





**Figura 11.** Representação do esclerito fálico na vista dorsal. As setas vermelhas e verdes apontam para o braço do esclerito pseudepifálico (Ps.arm). As setas em vermelho destacam as estruturas curvadas, já em verde estão as estruturas lineares. Já as setas azuis e laranja apontam para o ramo dorsal do esclerito pseudepifálico (Ps.db). As setas em azul destacam estruturas ligeiramente curvadas para dentro, já em laranja estão as estruturas ligeiramente curvadas para fora. \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

#### **4.6.3) Ps.im – Projeção interior do esclerito pseudopifálico**

É uma estrutura longa e com uma curvatura na sua parte mediana e uma dobra mais brusca no seu ápice. Não foi observada variação entre os indivíduos analisados, que seguem o padrão do holótipo de uma projeção interna pseudoepifálica longa e dobrada distalmente (Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017) (Figura 04).

#### **4.6.4) Ps.ib – Barras interiores do esclerito pseudoepifálico**

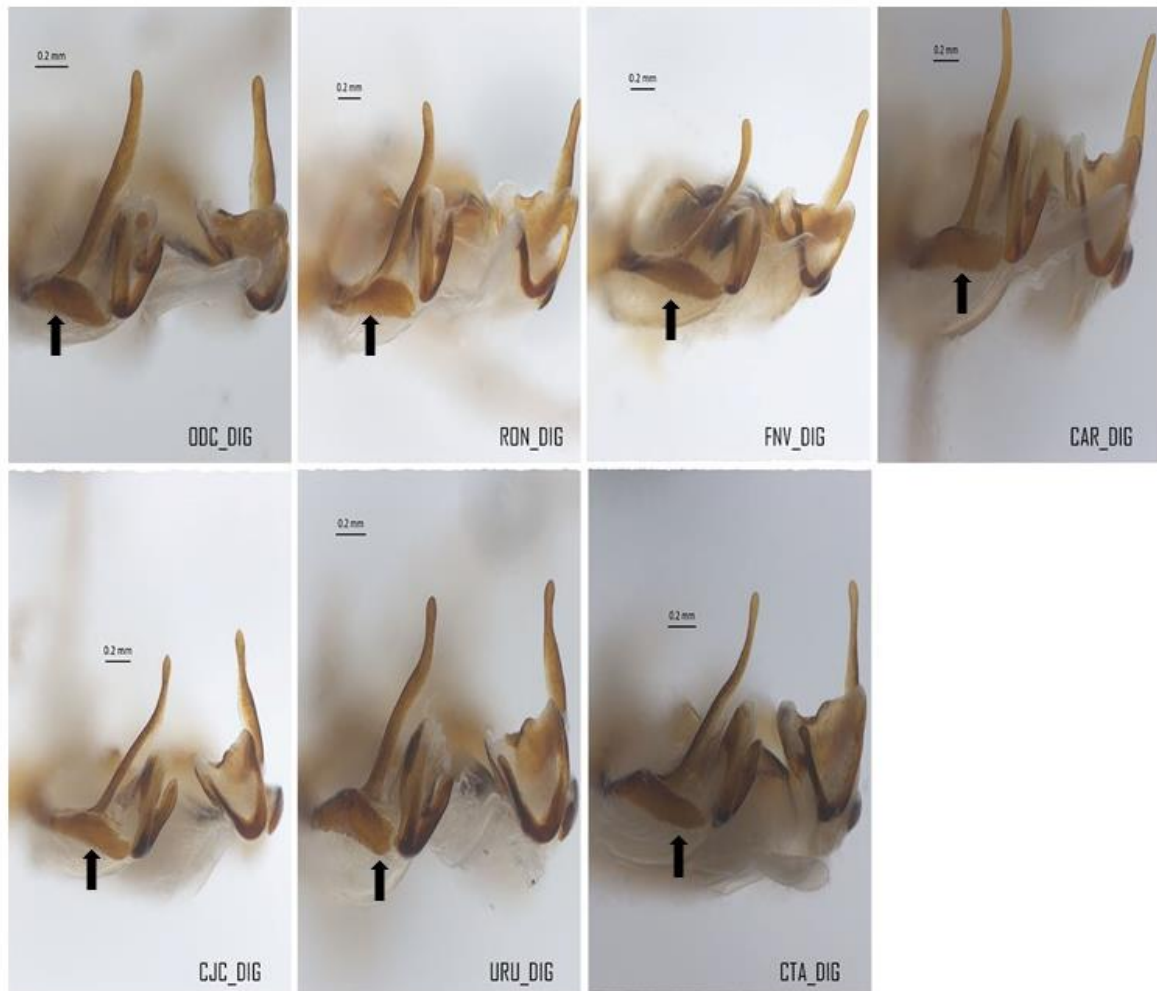
São estruturas que ligam os dois lados do pseudoepifalo (Figura 04). Mantendo o padrão do holótipo, todos os espécimes possuem a curvatura em forma de V.

#### **4.6.5) Ps.ms – Escudo membranoso do esclerito pseudoepifálico**

É uma membrana que está entre as barras interiores do esclerito pseudoepifálico (estrutura citada acima) e o ramo (r) (Figura 04). É uma estrutura que recobre as apódemas do ectófalco (Ect. Ap). Para todos os indivíduos analisados, essa estrutura é membranosa, sem nenhuma variação aparente, e situa-se entre Ps.ib e (r)

#### **4.6.6) Ps.vb – ramo ventral do esclerito pseudopifálico**

É uma projeção que está na posição ventral do esclerito. É facilmente evidente em vista diagonal (Figura 12). É uma estrutura esclerotizada e achatada, a membrana é o que a conecta ao parâmetro (estrutura adjacente). Em todos os indivíduos é possível perceber que se trata de uma estrutura bastante esclerotizada. Sem nenhuma variação aparente.



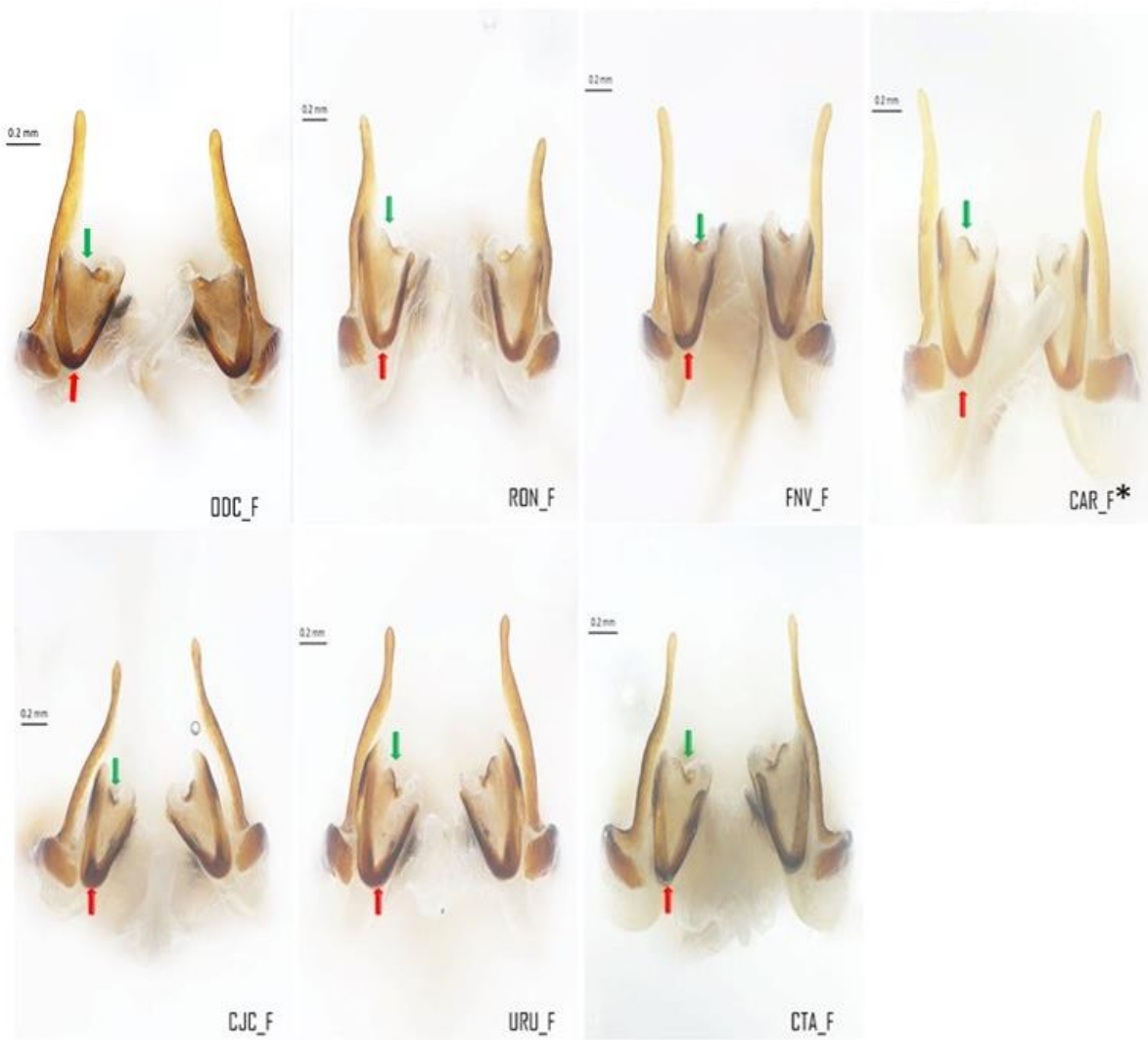
**Figura 12.** Representação do esclerito fálco na vista diagonal. As setas apontam para o ramo ventral do esclerito pseudepifálco (Ps.vb). \*Trata-se do parátipo de *E. potiguar*.

#### 4.6.7) Ps.P1 – Parâmero pseudepifálco 1

Trata-se de uma estrutura bem esclerotizada, achatada, em forma de U quando vista frontalmente. Além disso, essa estrutura possui uma projeção secundária interna chamada de (Ps.Pi) (Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017).

#### 4.6.8) Ps.P2 – Parâmetro pseudepifálico 2.

É uma estrutura bem menor quando comparado com Ps.P1. É esclerotizada e curvada para dentro do esclerito. Ela se conecta ao Ps.P1 por uma membrana. Nos indivíduos analisados, não foi encontrada nenhuma variação (Figura 13).



**Figura 13.** Representação do esclerito fálico na vista frontal. As setas vermelhas apontam para o Parâmetro pseudepifálico 1 (Ps.P1). As setas verdes apontam para o Parâmetro pseudepifálico 2 (Ps.P2) \*Trata-se do parátipo de *E. potiguar*.

#### 4.6.9) Ps.Pi = projeção interior do parâmero pseudoepifálico

É uma projeção secundária esclerotizada e curvada para dentro do esclerito que faz parte do parâmero 1 (Figura 14). Não foi observada nenhuma variação entre os indivíduos analisados.



**Figura 14.** Representação do esclerito fálico na vista frontal. As regiões destacadas apontam para a projeção interior do parâmero pseudoepifálico (Ps.Pi). \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

#### **4.6.10) r. = ramo**

Essa estrutura fica na base lateral do esclerito pseudoepifálico, e no caso destes indivíduos é bem alongada, esclerotizada e de formato de cone em sua ponta, ou seja, vai se afunilando (Figura 02 e 14). Não foram observadas diferenças suficientes entre os indivíduos analisados.

#### **4.6.11) Ect.Arc = arco ectofálico**

Normalmente é bem curvado (em vista dorsal) (Figura 02), mas pode apresentar modificações na sua parte superior e inferior. Não foram observadas variações entre os indivíduos analisados.

#### **4.6.12) Ect.mp = projeção mediana do esclerito ectofálico**

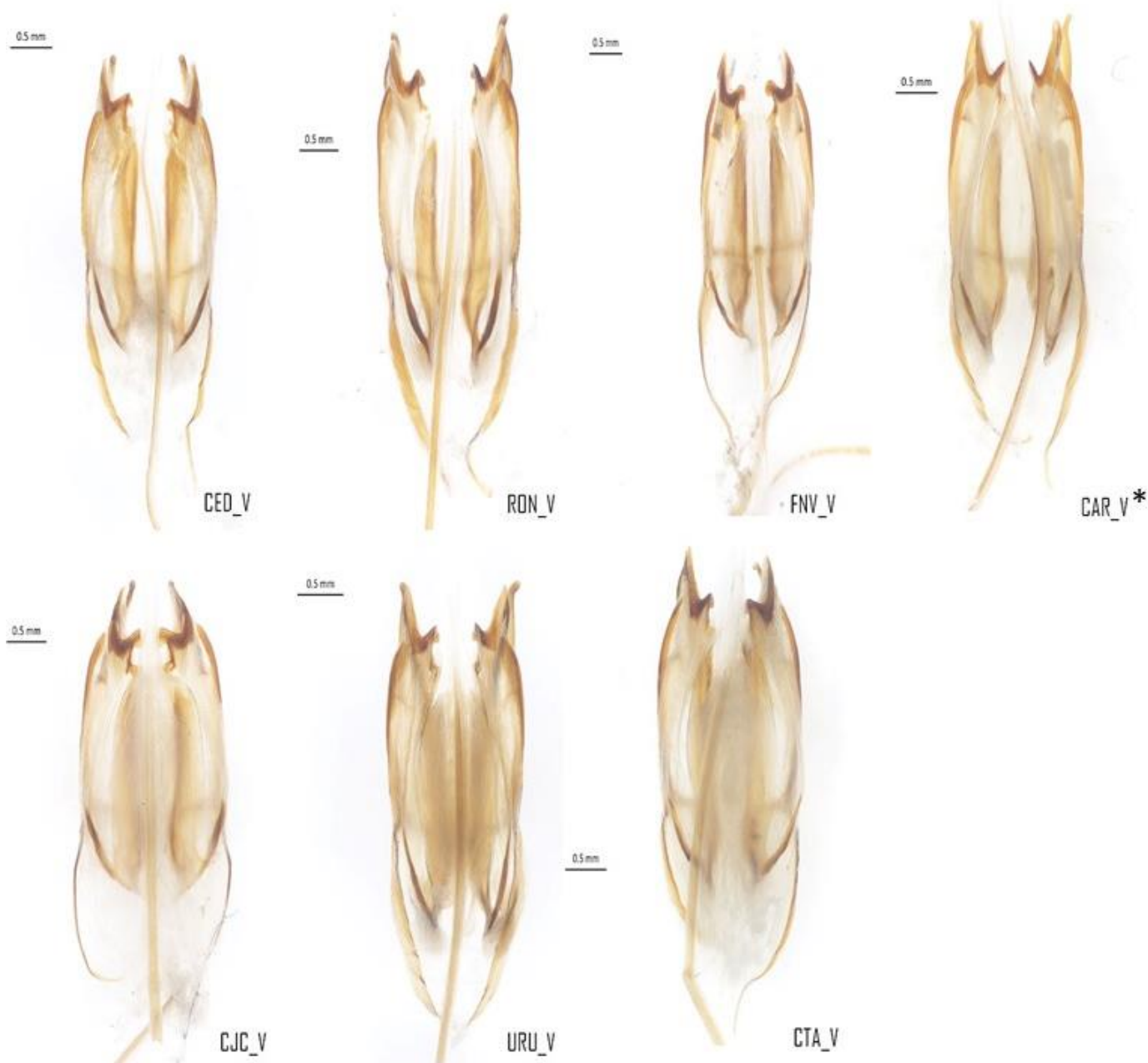
São as duas primeiras barras que rodeiam o arco ectofálico (ou seja, estão posicionadas internamente). Nestes indivíduos essas estruturas são bem desenvolvidas, achatadas na base e afiladas no ápice, formam uma placa achatada lateralmente (Figura 15). Todos seguem o padrão do holótipo, conforme descrito por Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017.

#### **4.6.13) Ect.lb = barras laterais do esclerito ectofálico**

Representam duas barras posicionadas na parte lateral do esclerito ectofálico, nesse caso são sinuosas e menores que as barras medianas do ectofálico (estruturas mostradas anteriormente), seguindo o padrão do holótipo (Castro-Souza, Zefa & Ferreira, 2017).

#### 4.6.14) Ect.Ap = Apódema do ectofálo

É uma estrutura bem desenvolvida, achatada e curvada dorsalmente nesses indivíduos. Está posicionada na base do esclerito, e neste local ocorre a inserção de membranas e músculos (Figuras 04 e 15). Não foi observada nenhuma variação entre os indivíduos analisados.



**Figura 15.** Representação do esclerito fálico na vista ventral. \*Trata-se do parátipo de *Endecous potiguar*.

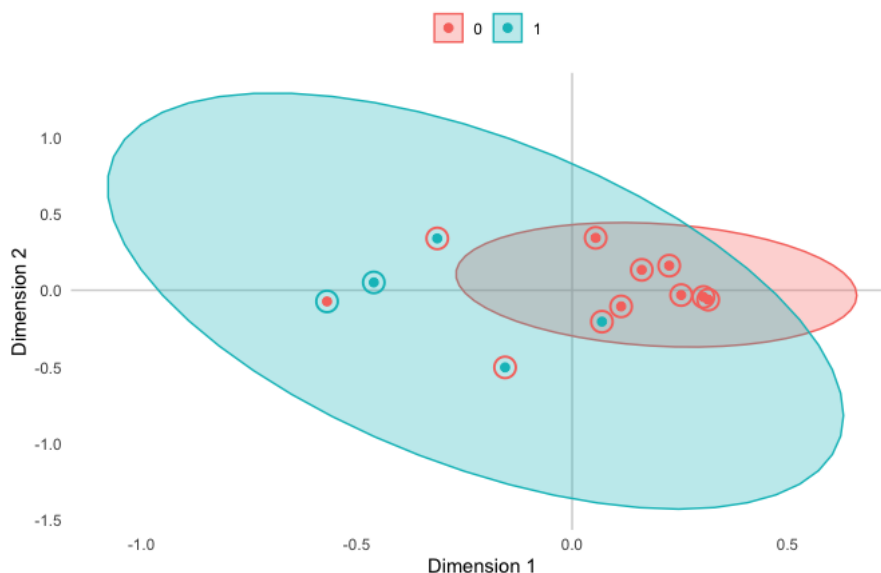
#### 4.7. Análises Bioacústicas

Devido à baixa diversidade de cavernas coletadas e para testar a hipótese do rio como barreira, buscou-se dividir os indivíduos em dois grupos de acordo com as margens do rio para as análises de Random Forest utilizando como variáveis as observadas na Figura 16.

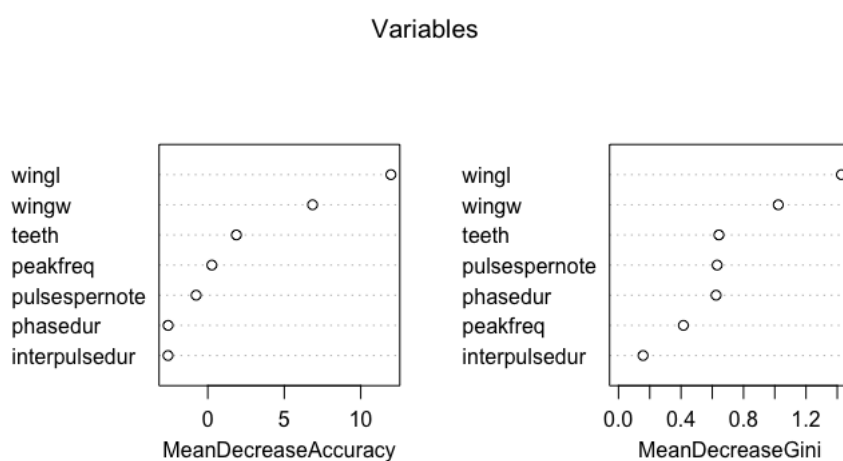
Os resultados do Random Forest revelaram um erro estimado (OOB) de 33,33%, e uma especial dificuldade da classificação resultante com o grupo 1 (margem esquerda do rio), para o qual só tínhamos 4 indivíduos gravados (Tabela 05). Com efeito, é possível ver uma grande sobreposição no escalonamento multidimensional dos escores de proximidade calculados pelo Random Forest (Figura 16). Por fim, a importância das variáveis baseada em valores decrescentes do índice de Gini e na acurácia sugerem que as variáveis largura e comprimento das asas (*wingl* e *wingw*) foram as mais importantes para discriminar entre as margens opostas do rio (Figura 17).

**Tabela 05.** Matriz de confusão (*Confusion Matrix*), mostrando os erros de classificação obtidos na análise.

Margem	N	Direita	Esquerda	Erro
Direita	8	7	1	0.125
Esquerda	4	3	1	0.75



**Figura 16.** Primeira e segunda dimensões do escalonamento multidimensional dos escores de proximidade de Random Forest considerando características acústicas e morfométricas de 12 espécimes de *Endecous potiguar* em margens opostas do Rio. As cores indicam os clados comparados: Azul margem esquerda, vermelho margem direita.



**Figura 17.** Importância das variáveis baseada no decréscimo de acurácia e no índice de Gini.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 – Espécies crípticas

As amostras analisadas apresentaram uma diversidade molecular significativa. Todavia, morfologicamente as linhagens apresentaram apenas diferenças muito sutis

e que não sustentam os clados vistos nas análises moleculares. Além disso, acusticamente, os clados não diferiram em nenhum dos caracteres analisados. De fato, estudos revelam que a diversidade críptica em organismos subterrâneos parece ser comum (Niemiller *et al*, 2013, Trontelj *et al*, 2009, Zeppellini *et al*, 2021).

O esclerito fálico de *Endecous potiguar* difere das demais espécies do gênero (Souza-Dias *et. al* 2017, Ferreira, Junta & Castro-Souza 2020). Com efeito, os diversos artigos de descrição de espécies do gênero mostram que essas estruturas são diferentes entre as espécies reconhecidas. Mesmo em espécies simpátricas como *Endecous troglobius* e *Endecous didymus*, existem diferenças morfológicas significativas no aparato reprodutor dessas espécies (Castro-Souza, Zefa & Ferreira 2020). Todavia, os espécimes aqui analisados apresentaram uma alta diferenciação molecular possivelmente representando duas espécies, porém estas diferenças não se refletiram tanto morfológica e acusticamente como a bioacústica.

Acusticamente, espécies diferentes do gênero *Endecous* são bem distintas. Zefa (2006) comparou sons de chamado de três populações alopátricas de *Endecous (Endecous) itatibenses* vendo variações no ritmo de emissão dos pares de notas. Castro-Souza, Zefa & Ferreira (2020) notaram variações na duração da frase e na quantidade de pulsos entre populações de *Endecous* simpátricas. No presente estudo, não detectamos diferenças morfológicas ou acústicas significativas entre as linhagens genéticas identificadas, todavia, a distância genética encontrada corresponde a mais que o dobro do que se costuma usar como limite interespecífico de insetos (Bianchi & Gonçalves, 2021). Tratando-se então de um caso típico de espécies crípticas.

Com efeito de que?, a especialização em ambientes cavernícolas comumente envolve a perda e/ou a redução de estruturas (pigmentação, olhos, etc), o que dificulta, em geral, a separação de clados próximos por caracteres morfológicos. Fiser *et al.*, (2018) propõem três hipóteses para explicar os mecanismos que causam a estase morfológica em espécies geneticamente distintas, porém crípticas: 1) Divergência recente; 2) Convergência Morfológica; e 3) Conservadorismo de Nicho Filogenético.

As linhagens recuperadas divergiram entre o Mioceno e o Plioceno. Nesse contexto, a primeira hipótese de divergência recente pode ser desconsiderada. A segunda hipótese sugere que a semelhança morfológica se deve a origens independentes em espécies distantes como resposta a pressões seletivas semelhantes. A análise da árvore filogenética nos mostra que os clados são monofiléticos e, por sua vez, tratam-se de espécies que não são distantes. Logo, essa hipótese também não explicaria a diversidade críptica das espécies. Por exclusão, o que melhor explicaria o que? seria a hipótese de conservadorismo de nicho filogenético, onde a estase morfológica em linhagens distintas é mantida por seleção estabilizadora.

## **5.2 – Diversificação alopática vicariante**

Segundo Coyne & Orr, (2004), o mecanismo mais comum para explicar tanto diversificação de linhagens como especiação é o de especiação alopátrica causada por uma barreira geográfica. Apesar dos processos de especiação alopátrica (vicariância e dispersão) serem centrais para a compreensão da diversificação, a biologia evolutiva ainda encontra um grande desafio para determinar quais fatores influenciam esses processos (Gallman *et. al*, 2020).

Os ambientes subterrâneos, por sua vez, acabam sendo sistemas ideais para examinar os mecanismos de isolamento, divergência e especiação (Katz *et al.*, 2018). Devido aos amplos intervalos de confiança em torno do tempo de divergência encontrado (7,40 Ma, entre 13,80–3,75 Ma, Mioceno/Plioceno), é difícil precisar quais processos foram responsáveis pela diversificação das linhagens encontradas (Figura 07). Todavia, esse intervalo abrange estimativas para a origem da calha do Rio Apodi-Mossoró, que ocorreu entre o Mioceno e o Quaternário (Bagni *et al.*, 2020). Com isso, o primeiro evento de diversificação pode ter ocorrido com a formação do rio Apodi-Mossoró, que inicialmente era um rio perene (Silva, Cestaro & Rabelo 2020), dividindo a população em duas margens opostas.

Todavia, para testar tal hipótese é necessário compreender melhor a história da paisagem onde as cavernas com ocorrência de *Endecous potiguar* estão inseridas. Além disso, uma amostragem molecular mais densa, de preferência usando múltiplos marcadores nucleares ou dados de sequenciamento de nova geração, contribuirão para testar a hipótese do rio como barreira, bem como outras hipóteses advindas da melhor compreensão da história das cavernas da formação Jandaíra.

### **5.3 – Diversificação por alternâncias climáticas**

Estudos de paleoclima indicam alternâncias climáticas no Nordeste desde meados do Pleistoceno até o presente (Cruz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004), sugerindo que o clima semiárido atual vem desde a transição do meio para o final do Holoceno, marcada por uma diminuição abrupta nas precipitações (Cruz *et al.*, 2009). Isso afetou diretamente o regime do rio Apodi-Mossoró, que passou de perene para intermitente, o que é observado até os dias de hoje (Henry-Silva, 2010).

Nesse contexto, o rio deixou de ser uma barreira geográfica, possibilitando um possível contato secundário entre as linhagens geograficamente mais próximas em

margens opostas. Isso é corroborado pelo agrupamento, em uma mesma população, de indivíduos com ocorrência em cavernas às margens opostas do rio.

A diminuição da umidade também gerou outro gatilho para diversificação: as espécies dependentes de umidade. De fato, alguns estudos com artrópodes sugerem que alternâncias climáticas no Pleistoceno levaram as populações da superfície a buscarem microrefúgios nas cavernas, por encontrarem melhores condições de sobrevivência (Bryson *et. al* 2014, Podnar *et. al* 2021, Bátori *et. al* 2022). Tal isolamento levou a mutações e conseqüentemente modificações morfológicas (troglomorfismo. *Eg.*: aumento da antena) e genéticas nas linhagens. Com efeito, a divergência molecular entre *Endecous\_sp* e *Endecous potiguar* a 7,99%, o que pode ser um estágio intermediário do processo de especiação onde diferenças morfológicas e bioacústicas ainda não tiveram tempo de ocorrer.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

Para a elucidação do *status* de espécie da principal linhagem aqui identificada, é necessário o aprofundamento dos estudos moleculares (por meio da inclusão de marcadores nucleares, por exemplo), bem como dos estudos morfológicos e bioacústicos. Além disso, recomenda-se a realização de estudos voltados a uma

maior compreensão da história da paisagem onde as cavernas com ocorrência de *Endecous potiguar* estão inseridas, o que pode esclarecer a atual distribuição das diferentes linhagens. No entanto, a necessidade de aprofundamento dos estudos não pode ser usada como justificativa para o adiamento de ações voltadas à conservação da grande variabilidade genética aqui encontrada.

## 7. REFERÊNCIAS

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JDM, & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, 22(6), 711-728.

Apostolopoulos, A. S. (2022). Diversity in darkness: shedding light on cryptic species in the cave beetle genus *darlingtonia* valentine using 3rad sequencing and consequences of climate change based on thermal tolerance and dehydration resistance.

Audacity® software is copyright © 1999-2021 **Audacity Team**.

Bagni FL, Bezerra FH, Balsamo F, Maia RP, & Dall'Aglio M. (2020). Karst dissolution along fracture corridors in an anticline hinge, Jandaíra Formation, Brazil: Implications for reservoir quality. **Marine and Petroleum Geology** 115, 104249. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2020.104249>.

Barr, T. C., & Holsinger, J. R. (1985). Speciation in cave faunas. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 313-337.

Bassitta, M., Buades, J. M., Pérez-Cembranos, A., Pérez-Mellado, V., Terrasa, B., Brown, R. P., ... & Ramon, C. (2020). Multilocus and morphological analysis of south-eastern Iberian Wall lizards (Squamata, Podarcis). **Zoologica Scripta**, 49(6), 668-683.

Bátori, Z., Gallé, R., Gallé-Szpisjak, N., Császár, P., Nagy, D. D., Lőrinczi, G., ... & Hornung, E. (2022). Topographic depressions provide potential microrefugia for ground-dwelling arthropods. **Elem Sci Anth**, 10(1).

Bento DM, Cruz JB, Freitas JIM, Campos UP, Oliveira AF. (2017). A mais de 1000! O patrimônio espeleológico potiguar após a descoberta da milésima caverna. In: Rasteiro, M.A.; Teixeira-Silva, C.M.; Lacerda, S.G. (orgs.) **Anais do Congresso Brasileiro de Espeleologia**: 227–237.

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

Bento DM, Lima SMQ, Souza-Silva M, Ferreira RL. (2019). Um oásis no semiárido nordestino: o Lajedo do Rosário, em Felipe Guerra/RN, como um novo hotspot de biodiversidade subterrânea. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) **Congresso Brasileiro de Espeleologia** (35): 560–575.

Bento, D.M, Souza-Silva, M., Vasconcellos, A., C Bellini, B., Prous, X., & L Ferreira, R. (2021). Subterranean “oasis” in the Brazilian semiarid region: neglected sources of biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, 30(13), 3837-3857.

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

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

Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M.A. & Lemey, P. (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. **Bioinformatics**, 27, 2910-2912.

Brasil. (1990). Decreto Lei n.º 99.556, de 01 de outubro de 1990. Dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF.

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

Breiman L. (2001). Random forests. **Machine Learning**, 45, 5–32.

Bryson, R. W., Prendini, L., Savary, W. E., & Pearman, P. B. (2014). Caves as microrefugia: Pleistocene phylogeography of the troglophilic North American scorpion *Pseudouroctonus reddelli*. **BMC Evolutionary Biology**, 14(1), 1-17.

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

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

Castro-Souza RA, Zefa E, Ferreira RL. (2020). New troglobitic and troglophilic syntopic species of Endecous (Orthoptera, Grylloidea, Phalangopsidae) from a Brazilian cave: a case of sympatric speciation?. **Zootaxa**, 4810(2).

Çetin, CÇ, Turantepe E. & Gürbüz M. (2021). Arthropoda fauna of Zindan Cave (Isparta, Turkey) with notes on new records and some ecological characteristics. **Turkish Journal of Entomology**, 45 (2) , 229-243 . DOI: 10.16970/entoted.889779  
Christiansen, KA. (2012). Morphological adaptations. In: WHITE, W. B.; CULVER, D. C. (Ed.). **Encyclopedia of caves**. Second edition. Amsterdam: Academic/Elsevier Press, pp. 517-528.

Cigliano, MM, Braun H, Eades DC & Otte D. (2020) **Orthoptera Species File**. Version 5.0/5.0.. Disponivel em<<http://OrthopteraSpeciesFile.org> >. Acessado em: 24 Janeiro de 2022)

Conti JB & Furlan AS. (2003). Geoecologia: O Clima, os Solos e a Biota. In: Ross, J. S. (Org.). Geografia do Brasil. 4. ed. 1 reimp. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**.

Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**.

Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**.

Coyne JA, & Orr HA. (2004). Speciation (Vol. 37). Sunderland, MA: **Sinauer associates**.

Cruz, FW, Vuille M, Burns SJ, Wang X, Cheng H, Werner M, Edwards RL, Karmann, I, Auler AS, Nguyen H. (2009). Orbitally driven eastwest antiphasing of South American precipitation. **Nature Geoscience** (2): 210–214.

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

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

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

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology** (11): 2571–2581.

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

Ferreira RL, Prous X, Bernardi LFO, Souza-Silva M. (2010). Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e impactos. **Revista Brasileira de Espeleologia 01**: 25–51.

Ferreira, R.L. (2019). Biologia subterrânea: conceitos gerais e aplicação na interpretação e análise de estudos de impacto ambiental, p.128-162. In: Cruz, J.B.; Piló, L.B. (Orgs). **Diretoria de Pesquisa, Avaliação e Monitoramento da Biodiversidade Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Fianco M, Souza-Dias PGB, Farias-Martins F, Magro S, Parasniewski VM, Ricci J, Zefa E, Szinwelski N. (2018). Ethology of the cricket *Endecous (Endecous) chape* Souza-Dias & de Mello, 2017 (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae) I: Agonistic and reproductive behavior. **Journal of Orthoptera Research 27**(2): 193–201.

Folmer M, Black W, Hoeh R, Lutz L, Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol 3**(5): 294-9.

Fu, YX. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**. 147(2): 915–925.

Fumey J, Hinaux H, Noirot C, Thermes C, Rétaux S, & Casane D. (2018). Evidence for late Pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. **BMC Evolutionary biology**, 18(1), 1-19.

Giribet G, Carranza S, Bagui J, Riutort, M, & Ribera, C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda Clade. **Molecular Biology and Evolution** (13): 76–84.

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

Hafner MS, Sudman PD, Villablanca FX, Sparadling TA, Demastes JW, Nadler SA. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. **Science** (365): 1087–1090.

Henry-Silva, G. G., Moura, R. S. T. D., & Dantas, L. L. D. O. (2010). Richness and distribution of aquatic macrophytes in Brazilian semi-arid aquatic ecosystems. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 22, 147-156.

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

Humphreys AM, Govaerts R, Ficinski SZ, Lughadha EN, & Vorontsova MS. (2019). Global dataset shows geography and life form predict modern plant extinction and rediscovery. **Nature Ecology & Evolution**, 3(7), 1043-1047.

ICMBio/CECAV (2018) **Áreas prioritárias para conservação do patrimônio espeleológico Brasileiro: primeira aproximação**. Brasília-DF. Disponível em: <[https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/Areas\\_Prioritarias\\_Patrimonio\\_Espeleologico\\_2018.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/Areas_Prioritarias_Patrimonio_Espeleologico_2018.pdf)>. Acesso em: 06 Jan. 2022.

Jeffery WR. (2009). Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. **Annual Review of Genetics**, 43, 25-47.

Jeffery WR. (2010). Pleiotropy and eye degeneration in cavefish. **Heredity**, 105(5), 495-496.

Jiang JR, Cai L, Liu F. (2017). Oligotrophic fungi from a carbonate cave, with three new species of *Cephalotrichum*. **Mycology**, v. 8, n. 3, p. 164–177.

Juberthie C. & Decu V. Encyclopaedia Biospeologia, 1994; Vol. 1. Moulis and Bucarest: **Société de Biospéologie**.

K. Lisa Yang Center for Conservation Bioacoustics at the Cornell Lab of Ornithology. (2022). Kane TC, Culver DC, Jones RT. Genetic structure of morphologically differentiated populations of the amphipod *Gammarus minus*. **Evolution**. 1992; 46: 272–278. pmid:28564956

Koppen, W. (1884). Die Wa"rmezonen der Erde, nach der Dauer der heissen, gem"ssigten und kalten Zeit und nach der Wirkung der Wa"rme auf die organische Welt betrachtet. – **Meteorol. Z.** 1, 215–226.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33(7), 1870–1874.

Lavoie KH, Helf KL, Poulson TL. (2007). The biology and ecology of North American cave crickets. **Journal of Cave and Karst Studies**, 69 (1), 114–134.

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

Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J. & Suchard, M.A. (2010) Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time. **Molecular Biology and Evolution**, 27, 1877-1885.

Liaw A. & Wiener, M. (2002). Classification and regression by random Forest. **R News**, 2, 18–22.

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

Maia RP, Sousa MOL, Bezerra FHR, Xavier Neto P, de Moura Lima EN, Silva CCN & Santos RD (2012) A importância do controle tectônico para a formação da paisagem cárstica na Bacia Potiguar, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Geomorfologia** 13(4).

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

Mayr E. (2005). *Biologia, ciência única*. **Editora Companhia das Letras**.

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2018) Portaria Nº 463, de 18 de dezembro de 2018. Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Repartição de Benefícios da Biodiversidade Prioritárias para a Biodiversidade. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, seção 1, n. 243, p. 160, 19 dez. 2018.

Newton LG, Starrett J, Hendrixson BE, Derkarabetian S, & Bond JE. (2020). Integrative species delimitation reveals cryptic diversity in the southern Appalachian *Antrodiaetus unicolor* (Araneae: Antrodiaetidae) species complex. **Molecular Ecology**, 29(12), 2269-2287.

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

Njunjić I, Perreau M, Hendriks K, Schilthuizen M, & Deharveng L. (2016). The cave beetle genus *Anthroherpon* is polyphyletic; molecular phylogenetics and description

of *Graciliella* n. gen.(Leiodidae, Leptodirini). **Contributions to Zoology**, 85(3), 337-359.

Oliveira FMP, Andersen NA, Arnan X, Ribeiro-Neto JD, Arcoverde GB, Leal IR. (2019). Effects of increasing aridity and chronic anthropogenic disturbance on seed dispersal by ants in Brazilian Caatinga. **Journal of Animal Ecology**, 88(6), 870–880.

Østbye, K., Østbye, E., Lien, A. M., Lee, L. R., Lauritzen, S. E., & Carlini, D. B. (2018). Morphology and life history divergence in cave and surface populations of *Gammarus lacustris* (L.). **Plos One**, 13(10), e0205556.

Pipan T, & Culver DC. (2019). Shallow subterranean habitats. In **Encyclopedia of caves** (pp. 896-908). Academic Press.

Podnar, M., Grbac, I., Tvrtković, N., Hörweg, C., & Haring, E. (2021). Hidden diversity, ancient divergences, and tentative Pleistocene microrefugia of European scorpions (Euscorpiidae: Euscorpiinae) in the eastern Adriatic region. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 59(8), 1824-1849.

Posada D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** (25): 1253–1256.

Protas M, Conrad M, Gross JB, Tabin C & Borowsky R. (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. **Current biology**, 17(5), 452-454.

Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.6.3) [Computer software]. Ithaca, NY: **The Cornell Lab of Ornithology**. Available from <https://ravensoundsoftware.com/>.

Silva EV, Cestaro LA, & Rabelo FDB. (2020). Biogeography and ecology of the mangroves ecosystem from the semiarid septentrional coast of Brazil. **Raega-O Espaço Geográfico em Análise**, 49, 22-41.

Silva JMC, Leal IR & Tabarelli M. (Eds.). (2018). Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. **Springer**.

Silva VPR. (2004). On climate variability in Northeast of Brazil. **Journal Arid Environments** (58): 575–596.

Simon C, Frati F, Beckenback A, Crespi B, Liu H, Flook P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** (87): 651–704.

Sket B. (2008). Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? **Journal of Natural History** 42(21):1549–1563.

Souza-Dias PGB, Bolfarini MP, Nihei SS & de Mello FAG. (2014) *Endecous apterus*: a new species of cave cricket from northeast Brazil, with comments on the use of subterranean habitats by *Luzarinae* crickets (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae: *Luzarinae*). **Zootaxa**, 3784 (2), 120–130.

Souza-Dias, P. G., Szinwelski, N., Fianco, M., Oliveira, E. C., Mello, F. A., & Zefa, E. (2017). New species of *Endecous* (Grylloidea, Phalangopsidae, *Luzarinae*) from the Iguaçu National Park (Brazil), including bioacoustics, cytogenetic and distribution data. **Zootaxa**.

Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics** 30(9):1312-3.

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

Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. 123(3): 585–595.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids Research**, 22(22), 4673–4680.

Torres-Paz J, Hyacinthe C, Pierre C & Rétaux S. (2018). Towards an integrated approach to understand Mexican cavefish evolution. **Biology letters**, 14(8), 20180101.

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

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

Weigand AM, Jochum A, Pfenninger M, Steinke D, & Klussmann-Kolb A. (2011). A new approach to an old conundrum—DNA barcoding sheds new light on phenotypic plasticity and morphological stasis in microsnails (Gastropoda, Pulmonata, Carychiidae). **Molecular Ecology Resources**, 11(2), 255-265.

Wilkins H. (2007). Regressive evolution: ontogeny and genetics of cavefish eye rudimentation. **Biological Journal of the Linnean Society**, 92(2), 287-296.

Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron SL, Joseph LEO & Trueman JW. (2011). Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. **Systematic entomology**, 36(2), 209-217.

Yoshizawa, K. (2004). Molecular phylogeny of major lineages of Trichadenotecnum and a review of diagnostic morphological characters (Psocoptera: Psocodae). **Systematic Entomology** (29): 383–394.

Zefa, E. (2006). Comparação do som de chamado de três populações alopátricas de *Endecous itatibensis* (Orthoptera, Phalangopsinae). Iheringia. **Série Zoologia**, 96, 13-16.

Zeppelini D, Oliveira JVL, Lima EC, Brito RA, Ferreira AS, Stievano LC & Lopes BC (2021). **Cryptic subterranean diversity in Collembola indicates that Hot Spot in ferruginous rock may have serious implications in Brazilian conservation policy.**

Zhang Y & Li S. (2014). A spider species complex revealed high cryptic diversity in South China caves. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 79, 353-358.

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