

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

*DNA Barcoding* revela o papel de rios como barreiras para  
diversificação de invertebrados cavernícolas no Planalto da  
Bodoquena, Brasil

Suzana Cunha Escarpinati

Dourados-MS  
Junho de 2014

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Suzana Cunha Escarpinati

*DNA Barcoding* revela o papel de rios como barreiras para diversificação  
de invertebrados cavernícolas no Planalto da Bodoquena, Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal da  
Grande Dourados (UFGD), como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E  
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.  
Área de Concentração: Biodiversidade e  
Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Oliveira Roque  
Coorientador: Edson Lucas dos Santos

Dourados-MS  
Junho de 2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

E743d Escarpinati, Suzana Cunha.  
*DNA Barcoding* revela o papel de rios como barreiras para diversificação de invertebrados cavernícolas no Planalto da Bodoquena, Brasil / Suzana Cunha Escarpinati. – Dourados, MS: UFGD, 2014.  
46f.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Oliveira Roque.  
Coorientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos  
Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Caverna. 2. Haplótipo. 3. Evolução. I. Título.

CDD – 551.57

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



# UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENTOMOLOGIA E  
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - DOUTORADO

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA PELA ALUNA SUZANA CUNHA ESCARPINATI, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO".

Aos dez dias do mês de abril de dois mil e quatorze, às 13h, em sessão pública, realizou-se, na Unidade II da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "DNA BARCODING REVELA O PAPEL DE RIOS COMO BARREIRAS PARA DIVERSIFICAÇÃO DE INVERTEBRADOS CAVERNÍCOLA NO PLANALTO DA BODOQUENA, BRASIL", apresentada pela doutoranda Suzana Cunha Escarpinati, do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, à Banca Examinadora constituída pelos professores Dr. Fabio de Oliveira Roque/UFMS (presidente/orientador), Dr. José Sabino/ANHANGUERA-UNIDERP (membro titular), Dr<sup>a</sup>. Aline Pedroso Lorenz Lemke/UFMS (membro titular), Dr. Valter Vieira Alves Junior/UFGD (membro titular), e Dr. William Fernando Antonialli Junior/UEMS (membro titular). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa da candidata. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA, fazendo jus ao título de DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 10 de abril de 2014.

Dr. Fabio de Oliveira Roque

Dr. José Sabino

Dr<sup>a</sup>. Aline Pedroso Lorenz Lemke

Dr. Valter Vieira Alves Junior

Dr. William Fernando Antonialli Junior

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_/\_\_/\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA/UFGD.

Prof. Cláudio Alves de Vasconcelos  
Pró-Reitor de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa  
Matr. n. 0432923

## AGRADECIMENTOS

Uma Tese é muito mais do que esta encadernação, é o conhecimento, a experiência, a vivência, o aprendizado, coisas refletidas aqui, mas impossíveis de serem ditas ou mesmo transmitidas.

Assim também são os agradecimentos, apenas refletem:

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados pelo acolhimento e pelos ensinamentos passados durante estes quatro anos;

Ao Prof. Dr. Fabio de Oliveira Roque, pela oportunidade, confiança e ensinamentos profissionais e de vida;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade e da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados pelos ensinamentos passados;

Ao Conselho Nacional de pesquisa – CNPq, pela bolsa concedida;

Ao Conselho Nacional de pesquisa – CNPq, pelo financiamento concedido ao projeto;

Ao *Canadian Centre for DNA Barcoding* - CCDB, pelo sequenciamento do marcador mitocondrial *Cytochrome c Oxidase Subunit 1 – Coi 1*;

Ao Mateus Pepinelli, facilitador no processo de sequenciamento do marcador mitocondrial *Coi 1*, realizado pelo CCDB;

Aos membros de minha banca de qualificação de doutoramento: Profs. Drs.: *i.* Fabrício Fagundes Pereira;*ii.* Jairo Campos Gaona;*iii.* Marcos Gino Fernandes;*iv.* Valter Vieira Alves Junior;*e v.* Willian Fernando Antonialli Junior, por terem contribuído com mais esta etapa em meu processo de formação.

Ao Laboratório de Planejamento de Organização do Turismo em Ambientes Naturais, do curso de Bacharelado em Turismo com ênfase em Ambientes Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS / Unidade Dourados, pelo empréstimo dos equipamentos de espeleologia, os quais garantiram a segurança pessoal durante as atividades de campo.

Ao Marcelo Cardoso Oliveira (Secretario deste Programa de Pós-Graduação) que mesmo recente, neste programa, têm se mostrado muito eficiente;

Aos meus colegas, membros do grupo de Espeleologia da Serra da Bodoquena - GESB, especialmente ao Keny Marques e ao Marcos Luis pela ajuda durante as atividades de campo;

Aos Bioespeleólogos Livia Cordeiro e Rodrigo Borguezam, também membros do GESB, pelo acolhimento durante todas as atividades de campo.

Ao Laboratório de Biologia Subterrânea da Universidade de São Paulo - USP, Coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eleonora Trajano, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa e pelo fornecimento de parte do material zoológico utilizado nesta tese.

Ao Laboratório de Evolução e Biodiversidade da UFMS, Coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Pedroso Lorenz Lemke, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, onde tive a oportunidade de amadurecer meu conhecimento em biologia molecular, biogeografia e evolução;

Ao pesquisador Prof. Dr. Juan Carlos da *Universidad de las Ilhas Belares* por aceitar meu pedido de estágio na Espanha;

Ao Juan Pons, pesquisador no *Mediterranean Institute for Advanced Studies*– IMEDEA pelo tempo dedicado no ensinamento de análises de coalescência;

Ao *Mediterranean Institute for Advanced Studies*– IMEDEA e aos seus funcionários pelo acolhimento durante meu período de estágio;

A este programa de Pós-graduação pelas passagens de ida e volta à Palma de Maiorca, Ilhas Baleares, Espanha, possibilitando meu estágio no IMEDEA;

Ao Emílio, Thaline, Silvia, Eduardo, Thiago, Laio, Marciel, pelo auxílio em campo;

Aos meus colegas de laboratório Mirian, Carolina, Mauricio, Francisco, Marciel, Clarissa, Sara, Elaine e Ricardo pela convivência.

Ao Francisco Valente Neto, pelas fotos capturadas, dos espécimes que utilizamos nesta tese;

Aos meus colegas de doutorado pela convivência;

Ao Programa de Pós-graduação de Ecologia e Conservação da UFMA, onde, atualmente desenvolvo minha pesquisa, pelo acolhimento.

Aos funcionários do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / Unidade Bonito, pela disponibilidade em ajuda;

Aos proprietários de fazendas por disponibilizar o acesso e aos seus respectivos funcionários pelo acolhimento durante as atividades de campo;

Aos assentados dos assentamentos Guaicurus e Canaã pelo acolhimento durante as atividades de campo.

Ao carinho, amor, apoio e incentivo recebido pelos meus pais, Sebastião Cunha Escarpinati e Diolinda Chimelli Escarpinati, durante toda minha vida;

Aos meus irmãos Marcelo Cunha Escarpinati e Mauricio Cunha Escarpinati, pelo carinho;

A graciosidade dos meus sobrinhos Diego, Matheus, Bruna e João Pedro por trazerem mais alegria para minha vida;

A Tica e a Monstrinha, minhas gatas, pela companhia diária;

Aos meus amigos Messias e Lívia que mesmo distante geograficamente estão presentes todos os dias da minha vida já faz uns bons anos.

## Dedicatória

Dedico essa tese a minha família e a meus amigos,  
pela confiança, respeito e companheirismo

*DNA Barcoding* revela o papel de rios como barreiras para diversificação de invertebrados cavernícolas no Planalto da Bodoquena, Brasil

Texto de Apresentação da Tese .....	1
Capítulo 1	
Desvendando a Biodiversidade em Cavernas através de <i>DNA Barcoding</i> : uma análise cienciométrica .....	2
Resumo .....	3
Introdução .....	4
Método .....	5
Resultados e Discussão .....	6
Referências Bibliográficas .....	13
Capítulo 2	
Sistema de drenagem como promotor de diversificação de invertebrados terrestres cavernícolas em uma região cárstica Neotropical .....	23
Resumo .....	24
Introdução .....	25
Método .....	26
Resultados .....	30
Discussão .....	34
Referências Bibliográficas .....	38

## Texto de apresentação da tese

Suzana Cunha Escarpinati<sup>1</sup>

Nas próximas páginas apresento minha Tese intitulada “*DNA Barcoding revela o papel de rios como barreiras para diversificação de invertebrados cavernícolas no Planalto da Bodoquena, Brasil*”. Nesta sintetizo as principais contribuições do uso de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea e utilizo dados de invertebrados de cavernas inseridas na área de drenagem da Bacia Hidrográfica do Rio Salobra, para testar o papel de rios como barreiras para a diferenciação gênica de invertebrados cavernícolas. O trabalho está organizado em dois capítulos complementares, que estão escritos na forma de artigo científico:

Capítulo 1.: “Desvendando a Biodiversidade em Cavernas através de *DNA Barcoding*: uma análise cienciométrica”. Este manuscrito, em elaboração com vista à submissão à revista *Brazilian Journal of Biology*. Este capítulo está cumprindo a regulamentação desta PPG, no que se refere à revisão bibliográfica.

Capítulo 2.: “Sistema de drenagem como promotor de diversificação de invertebrados terrestres cavernícolas em uma região cárstica Neotropical ”. Este manuscrito, em elaboração com vista à submissão à revista *Molecular Ecology Research*.

# Capítulo 1

A elaboração deste manuscrito segue as normas da revista *Brazilian Journal of Biology*

Desvendando a Biodiversidade em Cavernas através de *DNA Barcoding*: uma análise  
cienciométrica

Suzana Cunha Escarpinati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade – PPG-ECB; Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, 79825-070, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Resumo: A fim de entender a importância de *DNA Barcoding* e avaliar as tendências de seu uso em estudos de fauna subterrânea, utilizamos abordagem cienciométrica. Realizamos levantamento bibliográfico na base de dados Thomsom ISI utilizando o seguinte combinado de palavras chaves “(Cav\* OR Subterranean\* OR Underground\* OR Troglob\*)” + *Coi*; *Cox*; e *Barcod\** e complementamos nossa busca através da base de dados do BoldSystems e NCBI. Localizamos 71 artigos publicados e aproximadamente 50% utilizam apenas dados de *DNA Barcoding*. A maioria dos autores é Norte Americano ou Europeu. Este padrão se repete para a distribuição geográfica dos grupos taxonômicos. A concentração de trabalhos utilizando Malacostraca é decorrente da alta concentração de relictos paleobiogeográficos neste grupo taxonômico. Todas as unidades geopolíticas que tiveram sua fauna estudada têm extensas áreas em matriz calcária. Nitidamente encontramos crescimento exponencial do número de artigos que utilizam *DNA Barcoding* e a grande quantidade de áreas de *gap*, incluindo áreas biogeográficas inteiras, também indicam a quão promissora é a utilização de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea.

Palavras-chave: Subterrâneo; Caverna; Troglóbio; Publicação; Ciência; Genética.

Abstract: We evaluated the importance of *DNA Barcoding* and trends in its uses in studies of underground fauna. We used a scientometric approach and conducted bibliographical survey in Thomsom ISI database, using the following combination of keywords “Cav\* OR Subterranean\* OR Underground\* OR Troglob\*” + *Coi*; *Cox*; e *Barcod\**. Our search was supplemented through the BoldSystems and the NCBI database. We found 71 papers, being the first publication in 2001 and, approximately, 50% of them using only data from *DNA Barcoding*. Most authors are North American and European and this same pattern is repeated for the distribution of taxonomic groups. The concentration of paleobiogeography relict of Malacostraca living in caves, that explains the concentration of studies using these organisms. All political units which have studied its fauna have extensive karst areas. The clear exponential growth in the number of articles that used DNA Barcoding, connected to the large amount of gap areas, including whole continents, indicated how promising is the use of the *DNA Barcoding* in underground environmental studies.

Keywords: Underground; Cave; Stygofauna; Publication; Science; Genetics.

## 1. Introdução

Desde que Carl Linnaeus, cerca de 250 anos atrás, começou a classificar os organismos, os taxonomistas têm descrito cerca de 1,7 milhões de espécies, entretanto, mesmo que pareça um número alto, nosso conhecimento atual, nos permite afirmar que é apenas uma pequena fração das dezenas de milhões de espécies que compõem a real diversidade biológica (SALA *et al.*, 2000; BUTCHART *et al.*, 2010). O baixo número de taxonomistas, em relação ao número de espécies ainda desconhecidas, aumenta nossa preocupação acerca da crescente perda de diversidade, levando-nos a pensar em estratégias que acelere o conhecimento de novas unidades taxonômicas.

Pensando nisso que, em 2003, Paul Hebert e colaboradores, publicaram o artigo intitulado “*Biological identifications through DNA barcodes*” propondo a utilização do mtDNA *Cytochrome c Oxidase – Subunidade 1 (Coi 1)*, como um código de barras universal no conhecimento de *molecular operational taxonomic units* (MOTUs). A publicação alavancou a implementação do “*International Program Barcode of Life (Barcode of Life)*” (HEBERT *et al.*, 2003), o qual, atualmente têm centrado esforços em projetos destinados a ambientes que concentrem espécies com os seguintes critérios: *i.* são desconhecidas pela ciência; *ii.* são endêmicas; e *iii.* que formem complexo de espécies crípticas (são as espécies diferentes que são de difícil distinção, utilizando, apenas, caracteres morfológicos (BICKFORD *et al.*, 2007)) (MORITZ e CÍCERO, 2004). A peculiaridade da fauna cavernícola está, em grande parte, refletida em tais critérios, justificando a criação do subprojeto “*DNA Barcodes go Underground*” – GBOL - *Project ‘Subterranean Fauna’* (ver: <http://ibol.org/dna-barcodes-go-underground/>).

As espécies de animais totalmente adaptadas ao ambiente subterrâneo (espécies troglóbias), são caracterizadas pela regressão de um conjunto de caracteres (em especial os olhos, pigmentação e as asas) ou desenvolvimento de outros (em especial os sensoriais não visuais) (CHRISTIANSEN, 1962) e pela concentração de traços morfológicos altamente conservados presentes, especialmente, nos relictos paleobiogeográficos. Tanto conservação como o compartilhamento de caracteres dificulta não somente a utilização de caracteres morfológicos utilizados no sistema de classificação de seus respectivos grupos taxonômicos, mas, também a eleição de características capazes de diagnosticar espécies (BARR, 1968; BICKFORD *et al.*, 2007).

Apesar do incentivo ao uso de biologia molecular em estudos de biogeografia subterrânea (PORTER, 2007; JUAN *et al.*, 2010), não há publicações que sintetizem informações cronológicas e quantitativas acerca dos marcadores moleculares utilizados, da geopolítica dos autores e dos grupos taxonômicos utilizados nas publicações envolvendo dados de *Coi 1* para fauna de caverna. Neste trabalho, medimos as tendências temporais do uso de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea e as relacionamos com os grupos taxonômicos estudados, com as regiões geopolíticas mundiais e com os meios de divulgação. Para isso, utilizamos técnicas de cienciometria, como abordagem metodológica.

A cienciometria utiliza a literatura científica, como produto de nosso conhecimento, na tentativa de retratar os resultados alcançados pela ciência (MACIAS-CHAPULA, 1998) e têm ganhado força na sua meta de avaliar a importância de determinado assunto, autor e/ou trabalho, além de evidenciar as tendências e contribuições de uma determinada ferramenta, grupo taxonômico ou país em relação ao avanço científico e tecnológico mundial (MACIAS-CHAPULA, 1998; STREHL e SANTOS, 2002).

## 2. Métodos

Para medirmos de forma quantitativa a utilização do *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea, investigamos as publicações envolvendo fauna cavernícola que utilizaram sequências do gene mitocondrial *Coi 1*. Utilizamos a base de dados Thomsom ISI (disponível em: <http://apps.webofknowledge.com/>). Thomsom ISI é uma organização fundada por Eugene Garfield na Filadélfia (EUA), que constitui uma importante fonte para levantamentos ciênciometricos, processando anualmente um número elevado de periódicos que abrangem mais de cem áreas do conhecimento (STREHL e SANTOS, 2002). De forma complementar, buscamos por publicações na base de dados BoldSystems (Publication Search) (disponível em: [boldsystems.org/](http://boldsystems.org/)) e na base de dados do “National Center for Biotechnology Information” (disponível em: [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)).

Para localizar as publicações utilizamos o seguinte combinado de palavras chaves “(Cav\* OR Subterranean\* OR Underground\* OR Troglob\*)” somado (+) às seguintes palavras: *Coi*; *Cox*; e *Barcod\**. Assim, selecionamos, a partir dos trabalhos localizados, aqueles que utilizaram o *Coi 1* como marcador molecular. Buscamos por artigos publicados a partir do ano de 1990, já que a efetivação dos sistemas de

identificação molecular, com base em variação na sequência de DNA, surgiu na década de 1990 com o desenvolvimento de abordagens com base em PCR (*polimerase chain reaction*) (AVISE, 1994; 2000).

Para cada publicação consultamos as seguintes informações: *i.* tipo de documento publicado (artigo originais, revisão, carta, notas, resumos em anais de eventos, material editorial, correções); *ii.* ano de publicação; *iii.* local (periódico) de publicação; *iv.* fator de impacto atual (no caso de periódico); *v.* país de trabalho do primeiro autor (no caso de artigos com mais de um autor); *vi.* área geográfica de enfoque do estudo; *vii.* tipo de ambiente (aquático ou terrestre); e *viii.* grupo taxonômico. Não consideramos aquelas publicações que utilizam apenas espécies visitantes e/ou troglóxenas. Por outro lado, as consideramos, quando em trabalhos, que também incluem espécies troglóbias, comuns em trabalhos de revisão taxonômica. Consideramos válida a possibilidade de nossa pesquisa não capturar algumas publicações, principalmente as de circulação local.

Para visualizar a tendência temporal do número de artigos publicados contrapomos o número de trabalhos por ano com o tempo buscando o melhor ajuste da reta, através de uma regressão linear (FINLAY e WILKINSON, 1963; EBERHART e RUSSEL, 1966), utilizamos o Programa *Past* (HAMMER, 2002). Para as medidas de *iii* até *viii*, optamos por expressar os resultados graficamente ou por descrevê-los.

### 3. Resultados e Discussão

Encontramos 71 publicações desde 1990, todas publicadas na forma de artigo científico. O primeiro artigo foi publicado na revista *Evolution* em 2001 e têm 88 citações. Os autores Adalgisa Caccone (Norte Americana) e Valerio Sbordoni (Italiano) utilizaram sequências de *DNA Barcoding* em estudo de biogeografia de Leptodirini (Coleoptera, Choleviidae). Todos os artigos são originais, com exceção de três artigos de revisão que não tratam exclusivamente da utilização de *DNA Barcoding*. Os dois primeiros tratam do papel de dados moleculares nos avanços das teorias relacionadas aos processos evolutivos acerca da fauna de caverna e o mais recente artigo de revisão JUGOVIC *et al.* (2012) corresponde a revisão taxonômica. No primeiro artigo, de revisão, publicado em 2007, Porter reuniu as discussões acerca dos avanços e/ou mudanças das hipóteses relacionadas a estudos de biogeografia (PORTER, 2007). Em 2010 JUAN e colaboradores dando continuidade à compilação iniciada por Porter, acrescentam uma listagem de marcadores moleculares que foram utilizados para cada

grupo taxonômico, entretanto em momento algum os artigos fazem abordagem quantitativa (JUAN *et al.*, 2010).

O número de publicações é uma das medidas mais utilizadas para quantificar o progresso e a evolução da ciência (VERBEEK *et al.*, 2002). Mesmo que não tenhamos encontrado um valor de  $p$  significativo ( $p > 0.05$ ), a figura 1 mostra que após a primeira publicação em 2001, anualmente há artigos publicados sobre o assunto e para os últimos 5 anos, evidentemente, o crescimento é linear. Da mesma forma, é evidente, o aumento de pesquisadores interessados em incorporar aos seus estudos dados de sequências de *DNA Barcoding*, refletido na baixa repetição de autores entre as publicações (Anexo – Tabela 1).

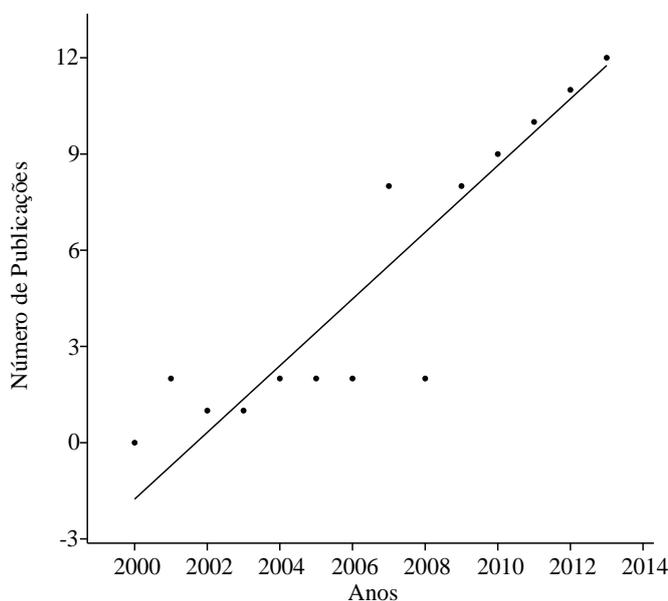


Figura 1. Número de trabalhos publicados durante o período de 2000 até 2013. Reta ajustada a partir de regressão linear ( $p > 0.05$ ), utilizando o Programa *Past* (HAMMER, 2002).

O sucesso no uso de *DNA Barcoding*, também, está impresso na quantidade de artigos publicados que utilizam apenas este marcador molecular. Aproximadamente metade (46 %) utilizaram apenas dados de sequências de *DNA Barcoding*, sendo que 31 deles utilizaram nuDNA na complementação de seus dados e 15 também utilizaram outros mtDNA. Quatro trabalhos utilizaram, apenas, outros marcadores mitocondriais na complementação de *Coi 1*. A maioria dos artigos utilizam apenas 1 ou 2 outros marcadores. Entre os marcadores mitocondriais, o 16S foi o mais comumente encontrado, seguido de 12S (Figura 2-B) e o marcador *cob* foi utilizado em um único

artigo. Entre os marcadores nucleares o gene NDI e o CAPDH foram utilizados em apenas um trabalho. A frequente utilização dos genes 18S, 28S e ITS são a mesma para fauna não cavernícola. Concordamos com ASPIRAS *et al.* (2012), que muitas lacunas em nosso conhecimento, seriam facilmente preenchidas, caso trabalhássemos com os genes de expressão de caráter troglomórficos. O mais recente trabalho que encontramos, ASMYHR *et al.* (2014), pioneiro na intensa utilização de microssatélites para fauna subterrânea, chama atenção para viabilidade do uso destes pequenos fragmentos de DNA, principalmente para estudos populacionais em pequenas escalas espaciais (>50m).

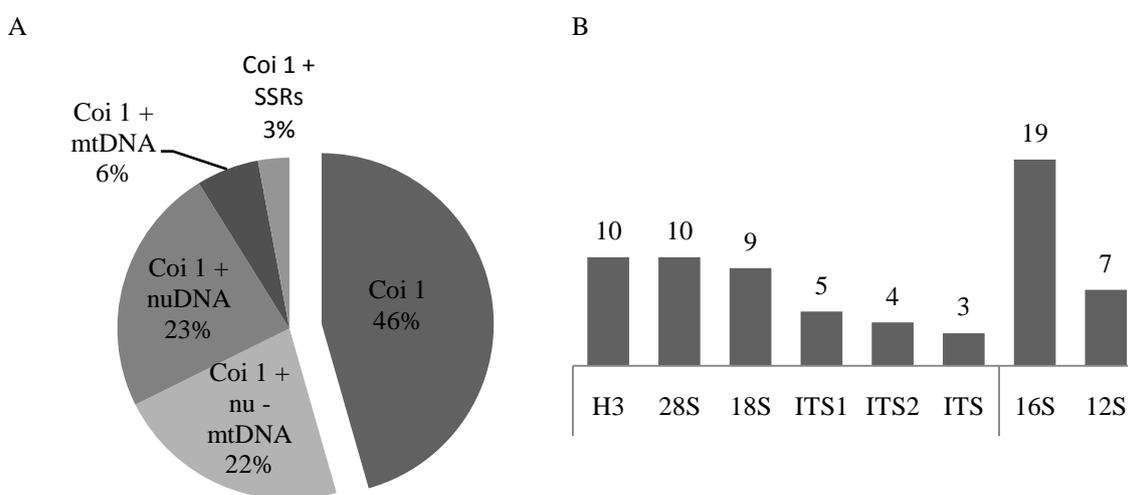


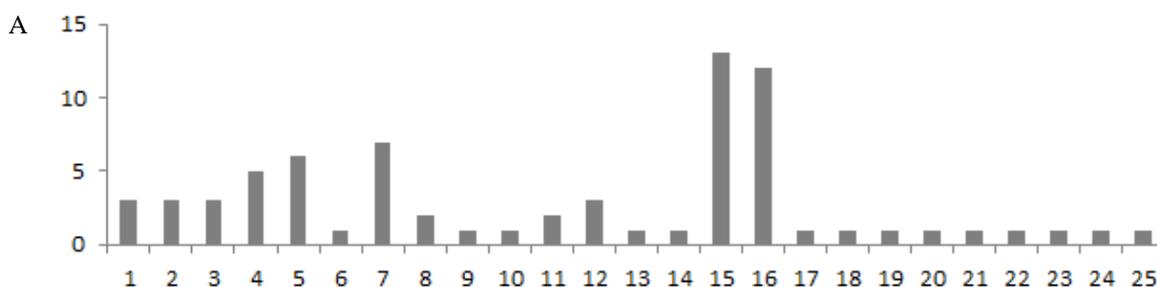
Figura 2: A. Gráfico com a distribuição do percentual dos tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos de *DNA Barcoding* de fauna de caverna; e B. Marcadores moleculares utilizados em dois ou mais artigos, com a indicação para o numero de artigos que os utilizaram. Não computamos os artigos de revisão e os que utilizam apenas microssatélite (n.: 67).

O sucesso no uso de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea é decorrente de fatores ligados à fauna: *i.* reconhecimento de altas taxas de endemismo (MORITZ e CÍCERO, 2004); *ii.* facilidade no reconhecimento de espécies crípticas (LEFÉBURE *et al.*, 2006); *iii.* viabilidade para teste de teoria evolutiva (PORTER, 2007). Como, também, aos fatores ligados ao uso de *DNA Barcoding*: *iv.* popularização de técnicas moleculares e conseqüente redução nos custos de análises (HEBERT *et al.*, 2003); e *v.* sucesso na identificação de diferentes grupos taxonômicos (HEBERT *et al.*, 2004; 2005). O aumento no numero de publicações acerca de fauna subterrânea utilizando a ferramenta de *DNA Barcoding*, não é diferente do encontrado para a fauna de outros ambientes, reflexo disto é a atual composição do *BoldSystems*(2.809.671 espécimes para 208.855 espécies) (ver: [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) e o número de citações

do artigo do “*Biological identifications through DNA barcodes*” publicado por HEBERT, *et al.* (2003) (3075 citações até a data de 10/05/2014).

A revista na qual o trabalho foi publicado é um dos critérios, para avaliação do contexto em que se insere o campo do conhecimento em análise (MACIAS-CHAPULA, 1998; VANTI, 2002). A crescente utilização de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea vem contribuindo para diferentes ramos da biologia com publicações em importantes revistas de estudos biogeográficos (p. ex.: *Journal of Biogeography*), evolutivos (*Molecular Phylogenetics and Evolution* e *BMC Evolutionary Biology*) e de ecologia molecular (com seis artigos publicados na *Molecular Ecology*) (Figura 3). O sucesso, na utilização de *DNA Barcoding* em estudos de fauna subterrânea, também está impresso na qualidade das publicações (~63% das publicações (45) está em revistas com fator de impacto igual ou superior a dois) indica a relevância de sua utilização em estudos de fauna subterrânea e garante a circulação do conhecimento adquirido. Ressaltamos que as três publicações da *Molecular Ecology Resources* (revista como maior fator de impacto – FI: 7.432) (uma publicação em 2010, uma em 2011 e a outra em 2013) utilizam somente dados de *DNA Barcoding*.

Revistas com maior número de publicações são as que incluem em seu escopo a viabilidade de publicações sobre descrição taxonômica como, por exemplo, *Zootaxa*, *Journal of Crustacean Biology* e a *Zoologica scripta*, o que possivelmente, é resultante do recente aumento no reconhecimento de complexo de espécies crípticas (BICKFORD *et al.*, 2007) (Figura 3). O compartilhamento de caracteres troglomórficos entre as espécies troglóbias, principalmente entre os relíctios paleobiogeográficos, dificultando a identificação apenas por comparações morfológicas (BICKFORD *et al.*, 2007), é importante incentivador para o uso *DNA Barcoding* como ferramenta no reconhecimento de MOTUs.



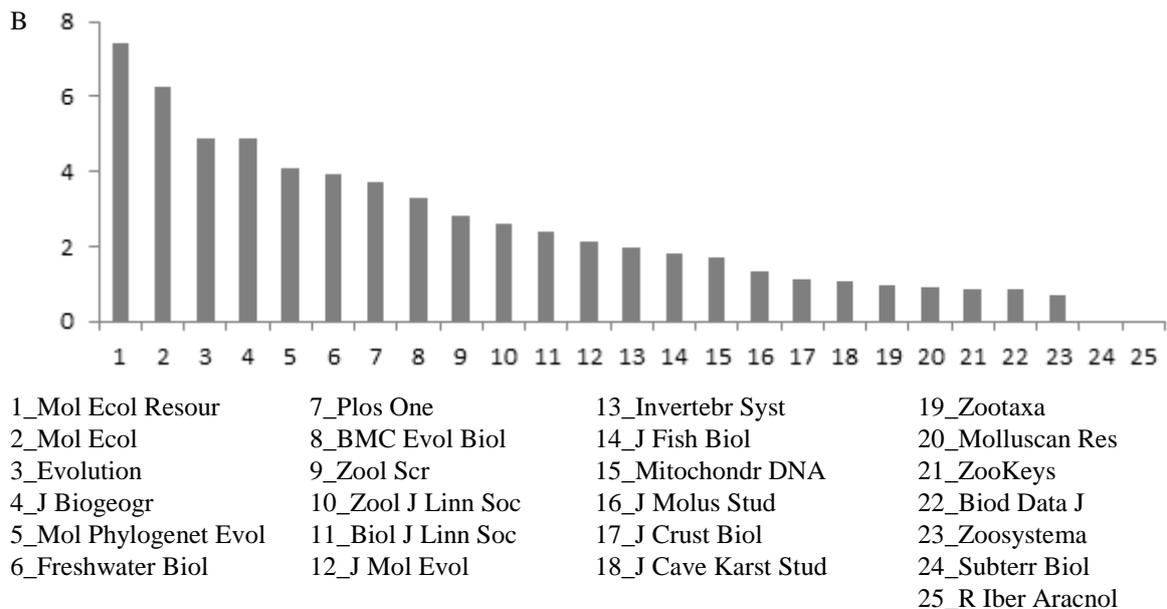


Figura 3. A- Número de trabalhos publicados para cada uma das 25 revistas de publicação dos 71 artigos que localizamos. B- Fator de impacto de cada uma das revistas.

Nós encontramos uma série de trabalhos revelando complexos de espécies crípticas (Tabela S\_1), o reflexo disso é o número de citações do trabalho de LEFÉBURE *et al.* (2006), com 110 citações. O uso de fauna subterrânea é historicamente reconhecido em estudos de teoria evolutiva (BARR, 1968; CULVER, 2009), não apenas pela bizarismo das formas troglomórficas, mas também, pela alta concentração de relictos paleobiogeográficos entre as espécies troglóbias, especialmente para Malacostraca, justificando as publicações em revistas especializadas no grupo taxonômico, como, por exemplo, a revista *Journal of Crustacean Biology*, favorecendo a concentração de trabalhos para fauna de ambiente aquático (~65%). Grupos taxonômicos chaves na compreensão de processos evolutivos também estão representados por Onychophora e por Remipedia (Figura 4).

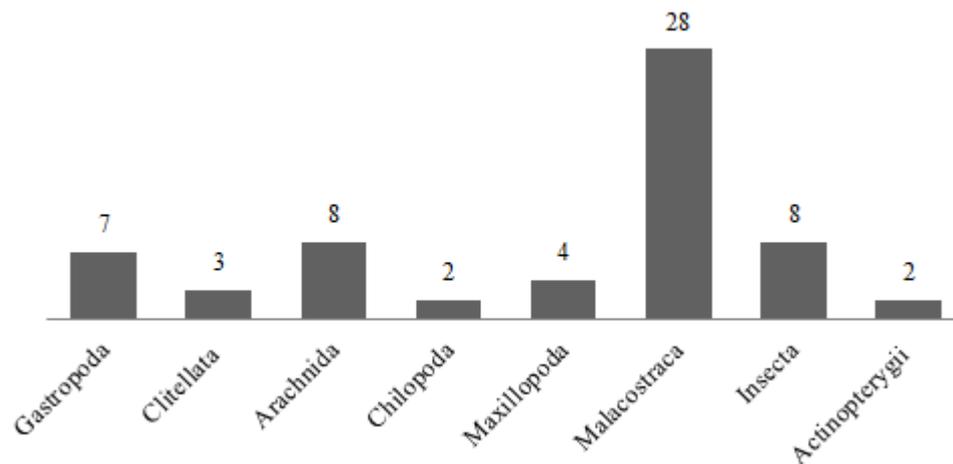


Figura 4. Número de artigos de acordo com o grupo taxonômico. Sempre que possível, nós os organizamos pelo nível taxonômico de classe. Não incluímos grupos taxonômicos que foram utilizados em apenas um artigo (Bivalvia, Porifera, Echinodermata, Onychophora, Crustacea, Diplopoda e Remipedia).

Os países com maiores números de publicação são: a Austrália, os Estados Unidos da América e a Espanha. Parte dos trabalhos escritos pelos norte americanos é com fauna procedente de outras regiões geopolíticas, situação contrária à Austrália e a Espanha (Figura 5). Segundo MUGNAINI *et al.* (2004) este padrão norte americano, reconhecido para diferentes linhas de pesquisa, é reflexo do número de pesquisadores e do investimento em infraestrutura e financiamento de pesquisas, não apenas por instituições públicas, mas também por empresas privadas e organizações não-governamentais. Treze países contam com apenas uma publicação (México, China, Coréia, Turquia, Irã, Polônia, Suécia, Noruega, Romênia, Holanda, Reino Unido, Bulgária e Croácia).

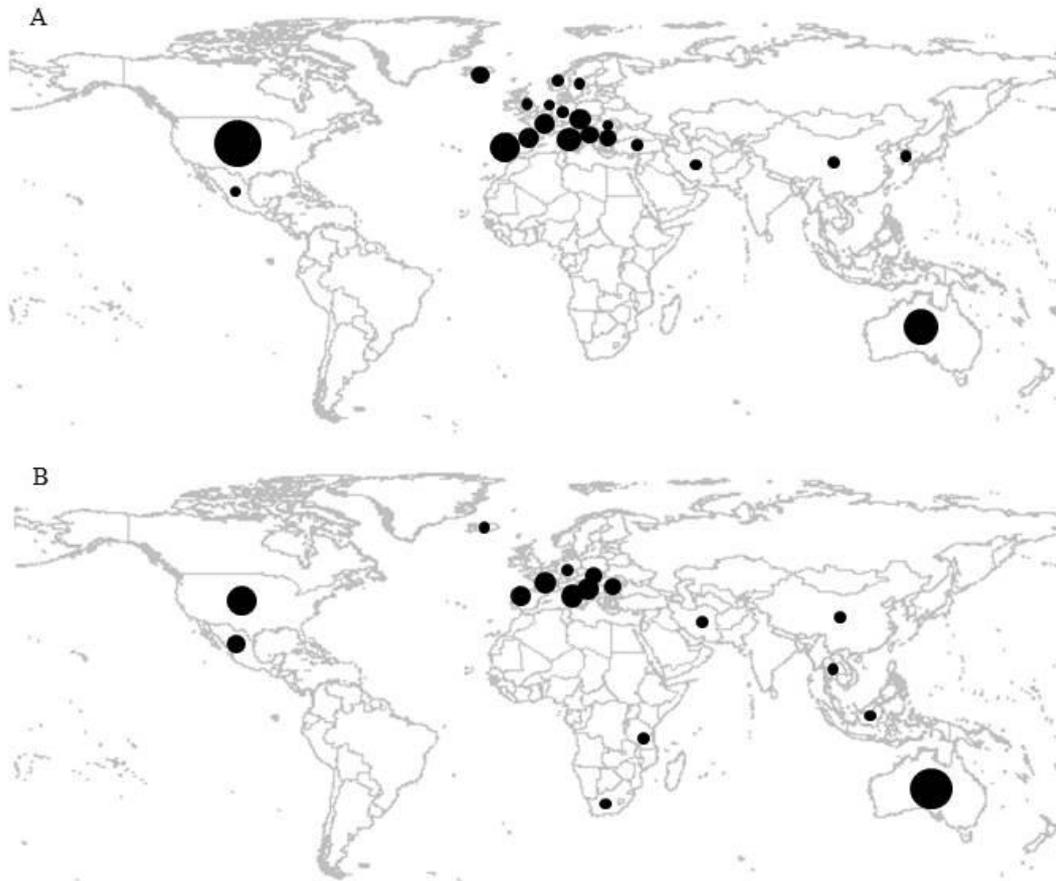


Figura 5. A-. Nacionalidade do primeiro autor. B- e número de trabalhos de acordo com a área geográfica (país) onde se desenvolveu o estudo. O tamanho do marcador representa o numero de artigos para o país.

Os pesquisadores de ambiente subterrâneo concordam que o conhecimento da fauna subterrânea ainda continua amplamente na escuridão. Além dos estudos se concentrarem no Hemisfério Norte, há regiões inteiras, onde não há informações de *DNA Barcoding*. A Região Neotropical, além de potencialmente abrigar numerosas cavernas, também é considerada uma região de alta diversificação biológica (WILLIG *et al.*, 2003). Em síntese, embora o uso de DNA barcoding, como demonstrado, tem contribuído para desvendar a biodiversidade subterrânea (HEBERT e GREGORY, 2005), o desafio de Linneus, ainda está impresso na concentração de espécies subterrânea desconhecidas pela ciência (TRAJANO, 2000; TRAJANO e BICHUETE, 2009).

Agradecimentos: Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutoramento (Project 483838/2010-1) e pela bolsa de produtividade concedida a meu orientado Fabio de Oliveira Roque (Process 303293/2009-8).

## Referências Bibliográficas

ASMYHR, MG., HOSE, G., GRAHAM, P. e STOW, AJ., 2014. Fine-scale genetics of subterranean syncarids. *Freshwater Biology*, vol. 59, p. 1-11.

ASPIRAS, AC., PRASAD, R., FONG, DW., CARLINI, DB. e ANGELINI, DR., 2012. Parallel reduction in expression of the eye development gene *hedgehog* in separately derived cave populations of the amphipod *Gammarus minus*. *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 25, p. 995-1001.

AVISE, JC., 1994. Molecular markers, natural history, and evolution. Chapman and Hall, New York.

AVISE, JC., 2000. Phylogeography. Boston, MA: Harvard University Press.

BARR, TC., 1968. Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evolutionary Biology*, vol. 2, p. 35-105.

BICKFORD, D., LOHMAN, DJ., SODHI, NS., NG, PK., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, KK. e DAS, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 22, p. 148-155.

BUTCHART, SH., WALPOLE, M., COLLEN, B., VAN STRIEN, A., SCHARLEMANN, JP., ALMOND, RE., JONATHAN, EM., BAILLIE, JEM., BOMHARD, B., BROWN, C., BRUNO, J., CARPENTER, KE., CARR, GM., CHANSON, J., CHENERY, AM., CSIRKE, J., DAVIDSON, NC., DENTENER, F., FOSTER, M., GALLI, A., GALLOWAY, JN., GENOVESI, P., GREGORY, RD., HOCKINGS, M., KAPOV, V., LAMARQUE, JF., LEVERINGTON, F., LOH, J., MCGEOCH, MA., MCRAE, L., MINASYAN, A., MORCILLO, MH., OLDFIELD, TEE., PAULY, D., QUADER, S., REVENGA, C., SAUER, JR., SKOLNIK, B., SPEAR, D., STANWELL-SMITH, D., STUART, SN., SYMES, A., TIERNEY, M. e CHRISTIANSEN, K., 1962. Proposition pour la classification des animaux cavernicoles. *Spelunca*, vol. 2, p. 75-78.

CULVER, DC., PIPAN, T. e SCHNEIDER, K., 2009. Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. *Freshwater Biology*, vol. 54, p. 918-929.

EBERHART, SA. e RUSSELL, WA., 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*, vol. 6, p. 36-40.

FINLAY, KW. e WILKINSON, GN., 1963. The analysis of adaptation in a Plant-Breeding Programme. *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 14, p. 742-754.

HAMMER, U., 2002. PAST version 0.98 statistical software. Palaontologisches Institut und Museum, Zurich; [http:// folk.uio.no/ohammer/past](http://folk.uio.no/ohammer/past).

HEBERT, PDN., CYWINSKA, A., BALL, SL. e WAARD, JR., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society A*, vol. 270, p. 313-321

HEBERT, PD., PENTON, EH., BURNS, JM., JANZEN, DH. e HALLWACHS, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, p. 14812-14817.

HEBERT, PD. e GREGORY, TR., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, vol. 54, p. 852-859.

JUAN, C., MICHELLE, TG., JAUNE, D. e COOPER, SJB., 2010. Evolution in caves: Darwin's "wrecks of ancient life" in the molecular era. *Molecular Ecology*, vol. 19, p. 3865-388.

JUGOVIC, J, JALŽIĆ, B., PREVORÈNIK, S. e SKET, B., 2012. Cave shrimps *Troglocaris* s. str. (Dormitzer, 1853), taxonomic revision and description of new taxa after phylogenetic and morphometric studies. *Zootaxa*, vol. 3421, p. 1-31.

LEFÉBURE, T., DOUADY, C.J., GOUY, M., TRONTEL, J.P., BRIOLAY, J. e GIBERT J., 2006. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, vol. 15, p. 1797-1806.

MACIAS-CHAPULA, CA., 1998. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. *Cientific Informatic*, vol. 27, p. 134-140.

MORITZ, C. e CÍCERO, C., 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology*, vol. 2, p. 1529-1531.

MUGNAINI, R., JANNUZZI, P. e QUONIAM, L., 2004. Indicadores bibliométricos da produção científica brasileira: uma análise a partir da base Pascal. *Cientific Informatic*, vol. 33, p. 123-131.

PORTER, M.L., 2007. Subterranean biogeography: What have we learned from molecular techniques? *Journal of Cave and Karst Studies*, vol. 69, p. 179-186.

SALA, O.E., CHAPIN, F.S., ARMESTO, J.J., BERLOW, E., BLOOMFIELD, J., DIRZO, R., HUBER-SANWALD, E., HUENNEKE, L.F., JACKSON, R.B., KINZIG, A., LEEMANS, R., LODGE, D.M., MOONEY, H.A., OESTERHELD, M., POFF, N.L., SYKES, M.T., WALKER, B.H., WALKER, M. e WALL, D.H., 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, vol. 287, p. 1770-1774.

STREHL, L. e SANTOS, C.A., 2002. Indicadores de qualidade da atividade científica. *Ciencia Hoje*, vol. 31, p. 34-39.

TRAJANO, E., 2000. Cave faunas in the Atlantic tropical rain forest: composition, ecology and conservation. *Biotropica*, vol. 32, p. 882-893.

TRAJANO, E. e BICHUETTE, M. E., 2009. Diversity of Brazilian subterranean invertebrates, with a list of troglomorphic taxa. *Subterranean Biology*, vol. 7, p. 1-16.

VANTI, NAP., 2002. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. *Ciência da Informação*, vol. 3, p. 152-162.

VERBEEK, A., DEBACKERE, K., LUWEL, M. e ZIMMERMANN, E., 2002. Measuring progress and evolution in science and technology - I: The multiple uses of bibliometric indicators. *International Journal of Management Reviews*, vol. 4, p. 179-211.

WILLIG, MR., KAUFMAN, DM. e STEVENS, RD., 2003. Latitudinal gradients of biodiversity: pattern, process, scale, and synthesis. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, vol. 34, p. 273-309.

Anexo Tabela A1– Planilha contendo um sumário das informações que obtivemos em cada um dos trabalhos encontrados durante nossa ciênciometria. Nós os separamos por ordem cronológica.

Título	Revista – Fator de Impacto Autor / Nacionalidade Ambiente / Grupo taxonômico / distribuição geográfica	mtDNA	nuDNA	SSR
<b>2014</b>				
1- Fine-scale genetics of subterranean syncarids.	Freshwater Biology - 3.933 Asmyhr M.G., <i>et al.</i> / Austrália A / Malacostraca / Austrália	-	-	-
<b>2013</b>				
2- Identification of echinoderms (Echinodermata) from an anchialine cave in Cozumel Island, Mexico, using DNA barcodes.	Mol Ecol Resour - 7.432 Bribiesca-Contreras G., <i>et al.</i> / México A / * Echinodermata / México	-	-	-
3- Integrative taxonomy of the freshwater worm <i>Rhyacodrilus falciformis</i> s.l. (Clitellata: Naididae), with the description of a new species.	Zool Scr - 2.793 Martinsson S., <i>et al.</i> / Suécia A / Clitellata / Europa	-	H3 ITS	-
4- <i>Nyx pholeocola</i> , a new genus nd cavernicolous species of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) from southern Thailand based on morphological and molecular data.	Zootaxa - 0.974 Harbach R.E., <i>et al.</i> / Reino Unido T / Insecta / Tailândia	-	ITS2	-
5- Evolution of microgastropods (Ellobioidea, Carychiidae): integrating taxonomic, phylogenetic and evolutionary hypotheses.	BMC Evol Biol - 3.29 Weigand A.M., <i>et al.</i> / Alemanha A / Gastropoda/ Europa e América	16S	H3	-
6- Evolutionary insight into the <i>Peripatopsis balfouri</i> sensu lato species complex (Onychophora: Peripatopsidae) reveals novel lineages and zoogeographic patterning.	Zool Scr - 2.793 Daniels S.R., <i>et al.</i> / USA T / *Onychophora / África do Sul	-	18S	-
7- Ancient lineage, young troglobites: recent colonization of caves by <i>Nesticella</i> spiders.	BMC Evol Biol - 3.29 Zang, Y. & Li, S. / China T / Arachnida / China	12S 16S	H3 28S 18S	-
8- Can Environment Predict Cryptic Diversity? The Case of <i>Niphargus</i> Inhabiting Western Carpathian Groundwater.	Plos One - 3.73 Meleg I.N., <i>et al.</i> / Romênia A / Malacostraca / Romênia	-	H3 28S	-
9- Phylogenetic analysis and systematic revision of Remipedia (Nectiopoda) from Bayesian analysis of molecular data.	J Crust Biol - 1.109 Hoenemann M., <i>et al.</i> / Austrália A / Remipedia / Europa e América	16S	H3	-
10- Historical biogeography and phylogeny of <i>Typhlatya cave shrimps</i> (Decapoda: Atyidae) based on mitochondrial and nuclear data.	J Biogeogr - 4.863 Botello A., <i>et al.</i> / Espanha A / Malacostraca / Europa e América	16S Cytb	H3 18S 28S	-
11- <i>Eupolybothrus cavernicolus</i> Komerički & Stoev sp. n. (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae): the first eukaryotic species description combining transcriptomic, DNA barcoding and micro-CT imaging data.	Biod Data J - 0.0 Stoev P., <i>et al.</i> / Bulgária T / Chilopoda / Europa e África	-	-	-
12- <i>Nesticus dimensis</i> new species, a new	Zootaxa - 0.974	16S	H3	-

troglobitic spider from Turkey (Araneae, Nesticidae), with comments on its phylogenetic relationships.	Lopez-Pancorbo A., <i>et al.</i> / Espanha T / Arachnida / Europa			
13- New <i>Zospeum</i> species (Gastropoda, Ellobioidea, Carychiidae) from 980 m depth in the Lukina Jama – Trojama cave system (Velebit Mts., Croatia).	Subterr Biol - 0,0 Weigand A.M. / Croatia T / Gastropoda / Croatia	-	-	-
<hr/>				
2012				
14- The Parvidrilidae – a diversified groundwater family: description of six new species from southern Europe, and clues for its phylogenetic position within Clitellata (Annelida).	Zool J Linn Soc - 2.583 Martínez-Ansemil E., <i>et al.</i> / Espanha A / Clitellata / Itália	-	18S	-
15- Undisclosed taxonomic diversity of Bathynellacea (Malacostraca: Syncarida) in the Iberian Peninsula revealed by molecular data.	J Crust Biol - 1.109 Camacho A.I., <i>et al.</i> / Espanha A / Malacostraca / Espanha	-	-	-
16- Divergent Molecular Lineages and Not-So-Cryptic Species: The First Descriptions of Stygobitic Chiltoniid Amphipods (Talitroidea: Chiltoniidae) from Western Australia.	J Crust Biol - 1.109 King R.A., <i>et al.</i> / Austrália A / Malacostraca / Austrália	-	-	-
17- Difficulties barcoding in the dark: the case of crustacean stygofauna from eastern Australia.	Invertebr Syst - 1.983 Asmyhr M.G. & Cooper S.J.B. / Austrália A / **Crustacea / Austrália	-	-	-
18- A redescription of the leggiest animal, the millipede <i>Illacme plenipes</i> , with notes on its natural history and biogeography (Diplopoda, Siphonophorida, Siphonorhinidae).	ZooKeys - 0.864 Marek P.E., <i>et al.</i> / EUA T / Diplopoda / EUA	-	-	-
19- A troglomorphic spider from Java (Araneae, Ctenidae, Amauropelma).	Zookeys - 0.864 Miller J. & Rahmadi C. / Holanda T / Arachnida / Indonésia	-	-	-
20- Phylogeography of <i>Troglophilus</i> (Orthoptera:Troglophilinae) based on Anatolian members of the genus: radiation of an old lineage following the Messinian.	Biol J Linn Soc - 2.413 Kaya S., <i>et al.</i> / Turquia T / Insecta / Europa	-	ITS	-
21- Molecular and morphological evidence supports the elevation of <i>Euscorpius germanus croaticus</i> Di Caporiacco, 1950 (Scorpiones: Euscorpiidae) to <i>E. croaticus</i> stat. nov., a rare species from Croatia.	R Iber Aracnol - 0.73 Graham M.R., <i>et al.</i> / EUA T / Arachnida / Croácia	-	-	-
22- Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb <i>Iranocypris typhlops</i> .	J Fish Biol - 1.834 Segherloo I.H., <i>et al.</i> / Iran A / Actinopterygii / Iran	-	-	-
23- Explosive radiation of the genus <i>Schizopera</i> on a small subterranean island in Western Australia (Copepoda Harpacticoida): unravelling the cases of cryptic speciation, size differentiation and multiple invasions.	Invertebr Syst - 1.983 Karanovic T. & Cooper S.J.B. / Coréia A / Maxillopoda / Austrália	-	-	-

24- Cave shrimps <i>Troglocaris</i> sp. str. (Dormitzer, 1853), taxonomic revision and description of new taxa after phylogenetic and morphometric studies.	Zootaxa - 0.974 Jugovic J., <i>et al.</i> / Eslovênia A / Malacostraca / Europa		Revisão		
<hr/>					
2011					
25- Molecular and morphological evidence for short range endemism in the <i>Kinnecaris solitaria</i> complex (Copepoda: Parastenocarididae), with descriptions of seven new species.	Zootaxa - 0.974 Karanovic T. & Cooper S.J.B. / Austrália A / Maxillopoda / Austrália	-	-	-	
26- Morphological and molecular analyses of closely related species in the stygobiontic genus <i>Niphargus</i> (Amphipoda).	J Crust Biol - 1.109 Hartke T.R., <i>et al.</i> / Alemanha A / Malacostraca / Alemanha	-	28S	-	
27- Discordance in Variation of the ITS Region and the Mitochondrial COI Gene in the Subterranean Amphipod <i>Crangonyx islandicus</i> .	J Mol Evol - 2.145 Kornobis E. & Pálsson S. / Islândia A / Malacostraca / Islândia	16S	ITS1 ITS2	-	
28- Molecular taxonomy and phylogenetic affinities of two groundwater amphipods, <i>Crangonyx islandicus</i> and <i>Crymostygius thingvallensis</i> , endemic to Iceland.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Kornobis E., <i>et al.</i> / Islândia A / Malacostraca / Europa, América e Ásia	16S	18S 28S	-	
29- Tempo and mode of species diversification in Dolichopoda cave crickets (Orthoptera, Rhabdophoridae).	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Allegrucci G., <i>et al.</i> / Itália T / Insecta / Europa	12S 16S	28S	-	
30- A new approach to an old conundrum—DNA barcoding sheds new light on phenotypic plasticity and morphological stasis in microsnails (Gastropoda, Pulmonata, Carychiidae).	Mol Ecol Resour - 7.432 Weigand A.M., <i>et al.</i> / Alemanha T / Gastropoda / Europa e América	-	-	-	
31- Phylogenetic analysis of ridgewayia (Copepoda: Calanoida) from the galapagos and of a new species from the florida keys with a reevaluation of the phylogeny of Calanoida.	J Crust Biol - 1.109 Figueroa D.F. / EUA A / Maxillopoda / Américas	-	ITS1 18S	-	
32- Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of <i>Astyanax</i> in Mexico (Characidae, Teleostei).	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Hausdorf B., <i>et al.</i> / Alemanha A / Actinopterygii / México				Cytb
33- Islands beneath islands: phylogeography of a groundwater amphipod crustacean in the Balearic archipelago.	BMC Evol Biol - 3.29 Bauzà-Ribot M.M., <i>et al.</i> / Espanha A / Malacostraca / Espanha	cob 16S	H3	-	
34- Molecular and morphological evidence for short range endemism in the <i>Kinnecaris solitaria</i> complex (Copepoda: Parastenocarididae), with descriptions of seven new species.	Zootaxa - 0.974 Karanovic & Cooper / Austrália T / Maxillopoda / Austrália	-	-	-	
<hr/>					
2010					
35- Evolution in caves: Darwin's "wrecks of ancient life" in the molecular era.	Mol Ecol - 6.275 Juan C., <i>et al.</i> / Espanha Revisão		revisão		
36- The Baikalian genus <i>Rhyacodriloides</i> in Europe: phylogenetic assessment of	Zool Scr - 2.793 Martin P., <i>et al.</i> / Espanha	12S 16S	18S	-	

Rhyacodriloidinae subfam. N. within the Naididae (Annelida).	A / Clitellata / Itália			
37- DNA barcoding of stygofauna uncovers cryptic amphipod diversity in a calcrete aquifer in Western Australia's arid zone.	Mol Ecol Resour - 7.432 Bradford T., <i>et al.</i> / Austrália A / Malacostraca / Austrália	-	-	-
38- The centípede genus <i>Eupolybothrus</i> Verhoeff, 1907 (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae) in North Africa, a cybertaxonomic revision, with a key to all species in the genus and the first use of DNA barcoding for the group.	ZooKeys - 0.864 Stoev P., <i>et al.</i> / Bulgária T / Chilopoda / África	-	-	-
39- Transfer of <i>Cochliopa texana</i> to <i>Pyrgulopsis</i> (Hydrobiidae) and description of a third congener from the lower pecos river basin.	J Molus Stud - 1.358 Hershler r., <i>et al.</i> / EUA A / Gastropoda / Américas	-	NDI	-
40- Unsuspected diversity of <i>Niphargus</i> amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy.	BMC Evol Biol - 3.29 Flot J-F., <i>et al.</i> / Alemanha A / Malacostraca / Itália	12S	ITS	
41- Genetic population structure of the Madison Cave Isopod, <i>Antrolana lira</i> (Cymothoidea: Cirolanidae) in the Shenandoah Valley of the Eastern United States.	J Crust Biol - 1.109 Hutchins B., <i>et al.</i> / EUA A / Malacostraca Isopoda / EUA	-	-	-
42 Taxonomic position of <i>Eunapius subterraneus</i> (Porifera, Spongillidae) inferred from molecular data – A revised classification needed?	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Hacert M., <i>et al.</i> / Croácia A / *Porifera / Austrália	-	ITS2 18S	-
43- Molecular systematics of eastern North American Phalangodidae (Arachnida: Opiliones: <i>Laniatores</i> ), demonstrating convergent morphological evolution in caves.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Hedin M & Thomas S.M. / Noruega T / Arachnida / EUA	-	-	-
<hr/>				
2009				
44- Fine-scale comparative phylogeography of a sympatric sister species triplet of subterranean diving beetles from a single calcrete aquifer in Western Australia.	Mol Ecol - 6.275 Cizik M.T., <i>et al.</i> / Austrália T / Insecta / Austrália	-	-	-
45- Testing phylogenetic hypotheses for reconstructing the evolutionary history of Dolichopoda cave crickets in the eastern Mediterranean.	J Biogeogr - 4.863 Allegrucci G., <i>et al.</i> / Itália T / Insecta / Itália	12S 16S	-	
46- The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp <i>Troglocaris anophthalmus</i> (Crustacea: Decapoda: Atyidae).	Mol Ecol - 6.275 Zakšek V., <i>et al.</i> / Eslovênia A / Malacostraca / Eslovênia	16S	ITS2	-
47- Phylogenetic relationships and description of a new stygobite species of <i>Bythinella</i> (Mollusca, Gastropoda, Caenogastropoda, Amnicolidae) from southern France.	Zoosystema - 0.696 Prié V. & Bichain J.M. / França A / Gastropoda / França	-	ITS1	-
48- Molecular evolution of the pDo500 satellite DNA family in Dolichopoda cave	BMC Evol Biol - 3.29 Martinsen L., <i>et al.</i> / Itália	-	-	pD0500

crickets (Rhaphidophoridae).	T / Insecta / Itália			
49- Molecular genetic variation and population structure in morphologically differentiated cave and surface populations of the freshwater amphipod <i>Gammarus minus</i> .	Mol Ecol - 6.275 Carlini D.B., <i>et al</i> / EUA A / Malacostraca / EUA	-	ITS1	-
50- Biogeography of the stygobitic isopod <i>Pygolabis</i> (Malacostraca: Tainisopidae) in the Pilbara, Western Australia: Evidence for multiple colonisations of the groundwater.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Finston T.L., <i>et al.</i> / Austrália A / Malacostraca / Austrália	-	-	-
51- The complete mitochondrial genome of the subterranean crustacean <i>Metacrangonyx longipes</i> (Amphipoda): a unique gene order and extremely short control region.	Mitochondr DNA - 1.273 Bauzà-Ribot M.M., <i>et al.</i> / Espanha A / Malacostraca / Espanha	Completo	-	-
<hr/>				
2008				
52- Taxonomic revision of cave crayfishes in the genus <i>Orconectes</i> , subgenus <i>Orconectes</i> (Decapoda: Cambaridae) along the Cumberland plateau, including a description of a new species, <i>Orconectes barri</i> .	J Crust Biol - 1.109 Buhay J.E. & Crandall K.A. / EUA A / Malacostraca / EUA	12S 16S	-	-
53- <i>Heleobia dobrogica</i> (Grossu & Negrea, 1989) (Gastropoda: Risssooidea: Cochliopidae) and the estimated time of its isolation in a continental analogue of hydrothermal vents.	Molluscan Res - 0.906 Falniowski A., <i>et al.</i> / Polónia A / Gastropoda / România	-	-	-
<hr/>				
2007				
54- A gleam in the dark: Phylogenetic species delimitation in the confusing spring-snail genus <i>Bythinella</i> Moquin-Tandon, 1856 (Gastropoda : Risssooidea : Amnicolidae).	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Bichain J-M., <i>et al.</i> / France A / Gastropoda / France	-	ITS1	-
55- Phylogeography of cave pseudoscorpions in northern Australia.	J Biogeogr - 4.863 Moulds T.A., <i>et al.</i> / Austrália T / Arachnida / Austrália		-	-
56- Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod ( <i>Niphargus rhenorhodanensis</i> ).	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Lefébure T., <i>et al.</i> / France A / Malacostraca / France	16S	28S	
57- Cryptic speciation in two widespread subterranean amphipod genera reflects historical drainage patterns in an ancient landscape.	Mol Ecol - 6.275 Finston T.L., <i>et al.</i> / Austrália A / Malacostraca / Austrália	-	-	-
58- Subterranean biogeography: What have we learned from molecular techniques?	J Cave Karst Stud - 1.057 Porter M.L. / EUA Revisão	revisão		
59- Molecular taxonomy in the dark: evolutionary history, phylogeography, and diversity of cave crayfish in the subgenus <i>Aviticambarus</i> , genus <i>Cambarus</i> .	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Buhay J.E., <i>et al.</i> / EUA A / Malacostraca / EUA	12S 16S	H3 GAPDH	
60- Phylogeny of the cave shrimp <i>Troglocaris</i> : Evidence of a young connection between Balkans and Caucasus.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Zakšek V., <i>et al.</i> / Slovenia A / Malacostraca / Europa	16S	28S	
61- Subterranean archipelago in the Australian arid zone: mitochondrial DNA	Mol Ecol - 6.275 Cooper S.J.B., <i>et al</i> / Austrália	-	-	-

phylogeography of amphipods from central Western Australia.	A / Malacostraca / Austrália				
<hr/>					
2006					
62- Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments.	Mol Ecol - 6.275 Lefébure T., <i>et al.</i> / França A / Malacostraca / França	-	28S	-	-
63- Brooding crustaceans in a highly fragmented habitat: the genetic structure of Mediterranean marine cave-dwelling mysid populations.	Mol Ecol - 6.275 Lejeune C. & Chevaldonné P. / França A / Malacostraca / Europa	-	-	-	-
<hr/>					
2005					
64- Molecular phylogeography of Dolichopoda cave crickets (Orthoptera, Rhabdophoridae): A scenario suggested by mitochondrial DNA.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Allegrucci G., <i>et al.</i> / Itália T / Insecta / Europa	16S	-	-	-
65- The genus <i>Cyphophthalmus</i> (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi) in Europe: A phylogenetic approach to Balkan Peninsula biogeography.	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Boyer S.L., <i>et al.</i> / EUA T / Arachnida / Europa	16S	H3 18S 28S	-	-
<hr/>					
2004					
66- The power and perils of 'molecular taxonomy': a case study of eyeless and endangered <i>Cicurina</i> (Araneae: Dictynidae) from Texas caves.	Mol Ecol - 6.275 Paquin P. & Hedin M. / EUA T / Arachnida / EUA	-	-	-	-
67- Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice <i>Asellus aquaticus</i> (Crustacea: Isopoda).	Mol Ecol - 6.275 Verovnik R., <i>et al.</i> / Eslovênia A / Malacostraca / Eslovênia	-	-	-	-
<hr/>					
2003					
68- Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic Stenasellid Isopods with a peri-Tyrrhenian distribution.	Mol Ecol - 6.275 Ketmaier V., <i>et al.</i> / Itália A / Malacostraca / Europa	-	-	-	-
<hr/>					
2002					
69- Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods (Oniscidea: Philosciidae): vicariant speciation or adaptive shifts?	Mol Phylogenet Evol - 4.107 Rivera M.A.J., <i>et al.</i> / EUA T / Malacostraca / EUA	-	-	-	-
<hr/>					
2001					
70- Molecular biogeography of cave life: A study using mitochondrial DNA from Bathysciine beetles.	Evolution - 4.864 Caccone A. & Sbordoni V. / EUA T / Insecta / Europa	-	-	-	-
71- Genetic diversity and evolutionary relationships of the troglodytic 'living fossil' <i>Congerius kusceri</i> (Bivalvia: Dreissenidae).	Mol Ecol - 6.275 Stepien C.A., <i>et al.</i> / EUA A / Bivalvia / Croácia	16S	-	-	-
<hr/>					

## Capítulo 2

A elaboração deste manuscrito segue, parcialmente, as normas da revista *Molecular Ecology Research*

Sistema de drenagem como promotor de diversificação de invertebrados terrestres cavernícolas em uma região cárstica Neotropical

Suzana Cunha Escarpinati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade – PPG\_ECB; Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, 79825-070, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Resumo: O reconhecimento de mecanismos ecológicos e evolutivos que podem explicar a diversificação em ambientes tropicais é um tema central na biologia evolutiva. Esta questão é especialmente relevante para ambientes discretos na natureza, como por exemplo, as cavernas, onde altas taxas de diferenciação genética e até mesmo de microendemismos são frequentemente registradas. Entretanto poucos estudos testaram fatores que geram diversificação e especiação em fauna cavernícola quando em pequenas escalas espaciais. Neste trabalho perguntamos se rios de pequeno porte, em uma matriz calcária, podem explicar a estrutura genética de populações de invertebrados cavernícolas em uma pequena escala espacial (600 km<sup>2</sup>). Para responder nossa pergunta, utilizamos dados sequência de mtDNA de populações de MOTUs de grilos (*Endecous*, Gryllidae) e de amblipígios (*Heterophrynus*, Amblypygi), viventes em cavernas localizadas na Bacia Hidrográfica do Rio Salobra, no centro oeste brasileiro. Nossos dados apoiam plenamente nossa previsão de que rios funcionam como barreiras para invertebrados, não aquáticos, de cavernas evidenciando que o efeito de barreira foi fortemente exercido pelo Rio Salobra, com subsequente efeito de barreira exercido pelo um de seus afluentes. Por fim discutimos as implicações de nosso achados para estratégias de conservação.

Palavras-chave: Rios; Troglóxenos; Grupo Corumbá; Subterrâneo; mtDNA.

Abstract: The recognition of ecological and evolutionary mechanisms that may explain the diversification in tropical environments is a central topic in evolutionary biology. This question is especially relevant for discrete environments, such as the caves, where high rates of genetic differentiation and microendemism are often recorded. However, few studies have tested factors that promote differentiation and speciation in cave fauna at small spatial scales. In this studied, we ask whether small rivers in a limestone matrix can explain the genetic structure of cave invertebrates in a small spatial scale. To answer our question we used mtDNA sequence data from crickets (*Endecous*) and amblipígios (*Heterophrynus*) populations which live in caves located in the Salobra River Basin. Our data strongly support our prediction that rivers serve as barriers to cave invertebrates, indicating that the barrier effect is greatly exercised by the Salobra River, with subsequent barrier effect exerted by Azul Stream. Finally we discuss the implications of our findings for conservation strategies.

Keywords: Rivers; Troglóxenos; Corumbá Group; Underground; mtDNA.

## 1. Introdução

Uma das explicações mais antigas para especiação nos trópicos é a hipótese de rios como barreiras geográficas (HRB). Em 1852, Alfred Russell Wallace foi o primeiro a sugerir que as espécies que ocorrem em um lado do rio Amazonas não ocorrem do outro lado, um padrão já bem descrito pelos nativos (Wallace 1852). Desde então, uma série de estudos avaliaram se populações com ancestralidade contínuas podem ter sido espacialmente subdividida pela formação de grandes rios, possivelmente gerando diferenciações específicas ou subespecíficas. Este padrão tem sido reconhecido para diferentes grupos, como para primatas (Wallace 1852; Ayres & Clutton-Brock 1992), aves (Hellmayr 1910; Bates 2004; Maldonado-Coelho *et al.* 2013), libélulas (Juen & De Marco-Jr 2011; 2012), opiliões (DaSilva & Pinto-da-Rocha 2011), borboletas (Elias *et al.* 2009) e besouros (Wilme *et al.* 2006).

A utilização de ambientes discretos, naturalmente fragmentados, funcionando como ilhas especializadas (MacArthur & Wilson 1967), potencializa nosso poder em reconhecer mecanismos geradores de padrões de diferenciação gênica (Moritz *et al.* 2000). Assim como, as ilhas oceânicas (Losos & Ricklefs 2009), topos de motanhas (Surina *et al.* 2014) e zonas abíçais (Rex *et al.* 2005), cavernas podem ser um ótimo modelo no reconhecimento da importância relativa dos processos vicariantes e dispersivos na diferenciação genética entre populações naturalmente isoladas, quando em pequenas escalas espaciais (Porter 2007). Entretanto a delimitação funcional de barreira física e/ou ambiental para fauna cavernícola é operacionalmente desafiadora, uma vez que é dependente tanto de fatores ligados à fauna (eg.: grupo taxonômico; grau de adaptação ao ambiente; tipo de hábitat (aquático ou terrestre) como, também, de fatores ligados à matriz rochosa (abundância e conectividade das cavernas) (Christman *et al.* 2005; Guzik *et al.* 2009).

Atualmente, para pequenas escalas espaciais, a melhor estratégia para detectar o papel de processos vicariantes na diferenciação gênica de fauna cavernícola é a busca por padrões congruentes, a partir de espécies troglófilas (Porter 2007, Culver *et al.* 2009). Os troglófilos são aquelas espécies que podem completar todo seu ciclo de vida na caverna, porém, não são habitantes obrigatórios deste ambiente (Culver 1982). Sua possibilidade de manter contato com populações hipógeas facilita o reconhecimento de barreiras físicas, externas ao ambiente subterrâneo (Caccone 1985; 2001; Christman *et al.* 2005), o que nos estimula utiliza-las para testar a HRB. Em nosso caso, guiados pela

HRB, perguntamos se rios superficiais, de pequeno porte, explicam padrões de diferenciação genética de espécies troglófilas em uma pequena escala espacial. Para isso, analisamos sequências de mtDNA obtidas para Molecular Operational Taxonomic Units – MOTUs para grilos e amblipídeos, viventes em cavernas do Planalto da Bodoquena, uma região Kástica no Centro Oeste Brasileiro.

Nosso desenho amostral nos permite levantar duas expectativas iniciais. Em primeiro, na ausência de barreiras à dispersão de invertebrados terrestres, esperamos encontrar populações panmíticas. Em contraste, qualquer mecanismo que impeça o contato das populações de diferentes cavernas, resultaria, ao menos, no baixo compartilhamento de haplótipos pelas populações. Uma vez atendida nossa segunda expectativa, nós testamos se a posição de pequenos rios de superfície coincide com os padrões de diferenciação genética dos MOTUs. Se no passado, os rios funcionaram como barreiras para estes invertebrados, o sinal do evento de vicariância estará presente no mtDNA. Caso isso aconteça, esperamos encontrar um padrão espacial e temporal concordante para os diferentes grupos taxonômicos, por terem experimentado o mesmo período de fragmentação ou de isolamento. O sinal de um evento de fragmentação histórica é detectável, mesmo se o fluxo de genes recomeçou subsequentemente (Avice & Selander 1972; Avice 1998).

## 2. Methods

### 2. 1. Local de estudo

Amostramos os MOTUs em 19 cavernas, distribuídas em uma área de ~72 Km<sup>2</sup>, na microbacia hidrográfica do Rio Salobra, a qual está praticamente toda, inserida na região Kástica do Planalto da Bodoquena, no Centro Oeste Brasileiro. A distribuição das cavernas em interfluxos contrários para o Rio Salobra (largura média 30 m) e para seu afluente, o Córrego Azul (largura média de 8 m) (Figura 1), nos permite testar, também, a congruência para corpos d'água.

O Planalto da Bodoquena é um mosaico dos dois *hotspots* de biodiversidade brasileiro: o Cerrado e a Mata Atlântica (Myers *et al.* 2000). Sua singularidade resultou na criação do Parque Nacional da Serra da Bodoquena (PNSB) e sua inclusão no Geopark Bodoquena-Pantanal (UNESCO 2009). O Planalto originou-se à ~543±2 Ma e é o afloramento rochoso mais representativo do grupo Corumbá, estendendo-se por ~1.000 km ao longo da Faixa Paraguai e ao longo do Cráton Amazônico e do Bloco Rio Apa (Alvarenga *et al.* 2011).

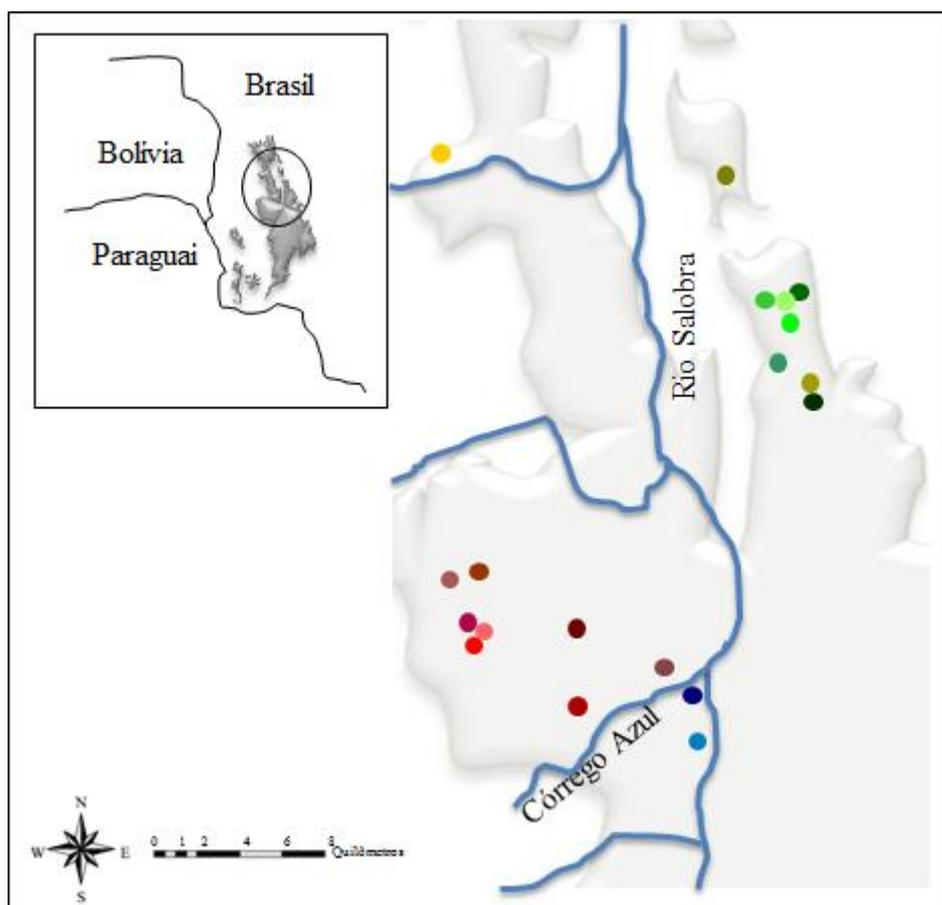


Figura 1. A. Mapa mostrando a distribuição das 19 cavernas e a posição do Rio Salobra e do Córrego Azul. Utilizamos o Programa Arcgis 10.1 (2010).

## 2. 2. Amostragem

Coletamos as amostras (indivíduos de grilos e de amblipídeos) por busca direta. No total utilizamos 125 amostras de invertebrados troglófilos. 105 amostras de *Endecous* (Grilliidae – Orthoptera) (66 para o MOTUs 1 (E1) e 39 para o MOTUs 2 (E2)) e 20 de *Heterophrynus* (Phrynidae – Amblypygi) (12 para o MOTUs 1 (H1) e 8 para o MOTUs 2 (H2)). O reconhecimento dos diferentes MOTUs, em campo, é possível devido à variação na concentração de caracteres troglomorfo. Os indivíduos de MOTUs 2 (de ambos os grupos taxonômicos), têm maiores evidências de aquisição de traços troglomórficos, como: *i.* despigmentação; *ii.* menor tamanho corporal; *iii.* asas reduzidas e totalmente membranosas (para *Endecous*); *iv.* redução dos órgãos de visão (olhos); e *v.* desenvolvimento de órgãos sensoriais (antenas). Entretanto vale ressaltar que a confirmação dos MOTUs foi realizada por especialistas (ver agradecimentos).

Para cada caverna, realizamos a busca pelos MOTUs de forma intensiva e o tempo de amostragem foi dependente do grau de desenvolvimento e de dificuldade de

acesso de cada caverna. No momento da captura armazenamos as amostras individualmente e as fixamos em etanol 100 %. Após 24 e 48 horas à coleta, drenamos e reabastecemos com etanol fresco (Stein *et al.* 2013). Por razões metodológicas (confirmação taxonômica e extração de tecido a partir de pequenos animais) matamos os indivíduos, entretanto seguimos o princípio 3R *refinement, reduction e replacement* (Russel & Burch 1992) e a legislação brasileira para a coleta e manuseio de animais cavernícolas (ICMBio/CECAV - Autorização para atividades com finalidade científica n.º. 22892-1).

### 2. 3. Extração, Sequenciamento e Alinhamento de sequências

Removemos uma pequena amostra de tecido de cada exemplar (de 1 mm até 5 mm) de partes do corpo que não são relevantes para a taxonomia: para *Endecous* uma perna do meio e para *Heterophrynus*, uma perna do terceiro par de pernas, sempre do lado direito do corpo (mantendo, a viabilidade das amostras para estudos taxonômicos).

O procedimento de extração, sequenciamento e alinhamento de DNA, foi realizado pelo *Canadian Centre for DNA Barcoding – CCDB*. A obtenção do código de barras padrão (658 pb) para o DNA Barcoding (*Coi 1*) foi sequenciado a partir de cada amostra, por meio de protocolos altamente automatizados para um formato de placa de 96 poços (ver: Ivanova *et al.* (2006) e [www.ccdb.ca/pa/ge/research/protocols](http://www.ccdb.ca/pa/ge/research/protocols) para detalhamento do protocolo – CCDB). Extratos de DNA foram amplificados por PCR usando o par de *primer* universal (C\_LepFolF (*forward*) e C\_LepFolR (*reverse*)) e o par de *primer* complementar ((MLepF1 (*forward*) e MLepR2 (*reverse*)) (Folmer *et al.* 1994), necessário, apenas, em algumas amostras de *Endecous*. Sequências genéticas e informações detalhadas sobre todos os exemplares estão disponíveis no *Barcode of Life Data Systems* [see: [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)] e podem ser acessadas por meio do código do projeto - BCMS.

### 2. 4. Análises Populacionais

Como utilizamos espécies de *Endecous* e de *Heterophrynus*, que ainda estão em processo de descrição taxonômica, inicialmente, calculamos a divergência nucleotídica, usando o modelo de evolução molecular *Hasegawa-Kishino-Yano* (HKY) (Hasegawa *et al.* 1985), modelo, de melhor, ajuste, para nossos dados (MODELTEST v3.7 (Posada & Crandall 1998)). Para reconhecemos as relações evolutivas entre as populações

(cavernas) dos MOTUs, utilizamos o programa *Network* e utilizamos o programa Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para estimar parâmetros genéticos básicos das populações (C/G, número de sítios polimórficos ( $S$ ), número de mutações do tipo transições, diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e diversidade haplotípica ( $h$ )).

Para cada MOTUs, exceto para H1 (ocorre apenas do lado direito do Rio Salobra), aplicamos duas estratégias analíticas. Em ambas as estratégias nós utilizamos apenas as populações com mais de dois indivíduos e utilizamos dados de latitude e longitude para gerar a matriz de distância geográfica.

Em primeiro lugar, usamos a *Spatial Analysis of Molecular Variance* - SAMOVA, implementada no SAMOVA v1.0 (Dupanloup *et al.* 2002), para avaliar o padrão de estrutura genética espacial. SAMOVA realiza uma série de análises de AMOVA para definir os grupos populacionais que se encontram geograficamente próximos e geneticamente semelhantes e que são maximamente diferenciadas entre si (Kirkpatrick *et al.* 1983). O objetivo é minimizar a quantidade de variação que ocorre dentro dos grupos ( $F_{sc}$ ) e maximizar a quantidade de variação que ocorre entre os grupos ( $F_{ct}$ ) (Manni *et al.* 2004) para reconhecermos, o número adequado de grupos ( $k$ ).

De forma complementar, utilizamos o programa BARRIER v.2.2 (Manni *et al.* 2004). Este programa usa a diferença máxima do algoritmo de Monmonier (Monmonier 1973) para detectar áreas de mudança abrupta na divergência entre populações, conectando pares de populações através das bordas da triangulação de Delaunay (Delaunay 1934). BARRIER mostra os locais e as direções das barreiras, a partir das semelhanças nos padrões espaciais de duas ou mais variáveis. Para mais bem suportar o posicionamento das barreiras, realizamos uma análise de *bootstrap* da matriz multilocus  $\theta_{ST}$  com 100 interações, usando o programa GENELAND v2.3.41 (Guillot *et al.* 2005a; b; 2008), baseado no software de análise estatística R v2.8.1 (R Development Core Team 2011). Barreiras com valores de *bootstrap* maiores que 50% são relatados neste estudo.

## 2.5. Análises demográficas

Nós examinamos a história demográfica das populações utilizando análise de *mismatch distribution*, para distinguir as populações que têm sido estável ao longo do tempo daquelas que experimentaram expansão demográfica recente (Schneider & Excoffier 1999; Excoffier 2004), como implementado em ARLEQUIN v3.5. Para isso empregamos 100 simulações de interação para testar o ajuste do valor observado ao

esperado, diante de um modelo de expansão súbita, usando a soma dos desvios quadrados (SSD).

Porque *mismatch distribution* tem baixo poder estatístico (Librado & Rozas 2009), utilizamos estatística  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas 2002),  $D$  de Tajima (Tajima 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu 1997) para buscar condições de ausência de equilíbrio dentro das linhagens. Teste  $F_s$  é sensível a grandes populações, enquanto que  $R_2$  é sensível a populações menores (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Embora os valores significativamente positivos ou negativos destas análises podem indicar mudanças demográficas ou efeito de seleção, comparações desses resultados aos de incompatibilidade de distribuição são assumidos para produzir interpretações mais robustas da história demográfica. Valores críticos de  $D$  (Tajima 1989) e significância de  $F_s$  e  $R_2$  foi determinado a partir de 1.000 simulações, assumindo que não há recombinação (DnaSP v 5.0, Librado & Rozas 2009). De forma que  $F_s$  deve ser considerado como peso significativo para  $P < 0.02$  (valor de  $P$  a partir da simulação coalescente de 0.02). Calculamos análise da distribuição incompatibilidade,  $R_2$ ,  $D$  e  $F_s$  para as populações com mais de quatro indivíduos.

Sabendo que apenas a migração e a mutação podem importar novos alelos a um haplótipo, calculamos a taxa de migração gênica entre os grupos SAMOVA, como implementado em MIGRATE-N v.2.3.3 (Beerli & Felsenstein 1999; 2001; Kingman 2000; Beerli 2006).

### 3. Resultados

#### 3.1. Análises populacionais e demográficas

As taxas de divergência genética que encontramos para *Endecous* (~15%) e *Heterophrynus* (~7 %), concordam com a taxa mínima de 2%, proposto por Hebert *et al.* 2003. Particularmente em relação aos grilos de cavernas, as taxas de divergência interespecífica variam de 3% até 20% (Allegrucci *et al.* 2005; 2009; 2011) e para Arachnida a utilização de um limiar de 2%, permite reconhecer as unidades operacionais taxonômicas (OTUs) (Barrett & Hebert 2005).

A variação do número de sítios polimórficos, separando os haplótipos de cada um dos MOTUs, está expressa nos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica que encontramos (Tabela 1). Os maiores valores de diversidade haplotípica e de diversidade nucleotídica ( $\times 10^{-3}$ ) que registramos para E2 e H2 são reflexos da quantidade de sítios polimórficos que separam os haplótipos e do baixo compartilhamento de haplótipos

entre cavernas (Tabela 1) (Figura 2). De maneira oposta, o compartilhamento de um mesmo haplótipo do H1, pela maioria das populações (cavernas), resultou no baixo valor de diversidade haplotípica. O baixo valor da diversidade nucleotídica para o MOTU II de *Endecous* (Tabela 1) é resultante do pequeno número de sítios polimórficos que separam seus haplótipos (1 sítio polimórfico) (Figura 2).

Tabela 1. Tamanho da amostra, número de haplótipos, percentual de C/G, número de transições, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica ( $\times 10^{-3}$ ) para os MOTUs de *Endecous* e de *Heterophrynus* viventes nas 19 cavidades inseridas na Bacia hidrográfica do Rio Salobra.

	<i>Endecous</i>		<i>Heterophrynus</i>	
	MOTU I	MOTU II	MOTU I	MOTU II
Tamanho da amostra	66	39	12	8
Nº de haplótipos	9	10	2	5
CG (%)	17.41; 16.01	20.91; 15.67	26.18; 16.57	27.51; 15.26
Nº de transições	7	19	1	11
Nº de sítios polimórficos	9	23	1	11
Diversidade haplotípica	0.696 $\pm$ 0.054	0.852 $\pm$ 0.033	0.303 $\pm$ 0.147	0.904 $\pm$ 0.103
Diversidade nucleotídica ( $\times 10^{-3}$ )	2.253 $\pm$ 1.532	6.205 $\pm$ 3.515	0.461 $\pm$ 0.577	8.987 $\pm$ 5.594

As topologias das networks concordam com os agrupamentos SAMOVA que obtivemos para os MOTUs. A posição das barreiras geradas em BARRIER revela que a posição do Rio salobra e do Córrego Azul é coincidente com a separação dos MOTUs e com a separação de seus respectivos haplótipos (Figura 2 e Tabela 2).

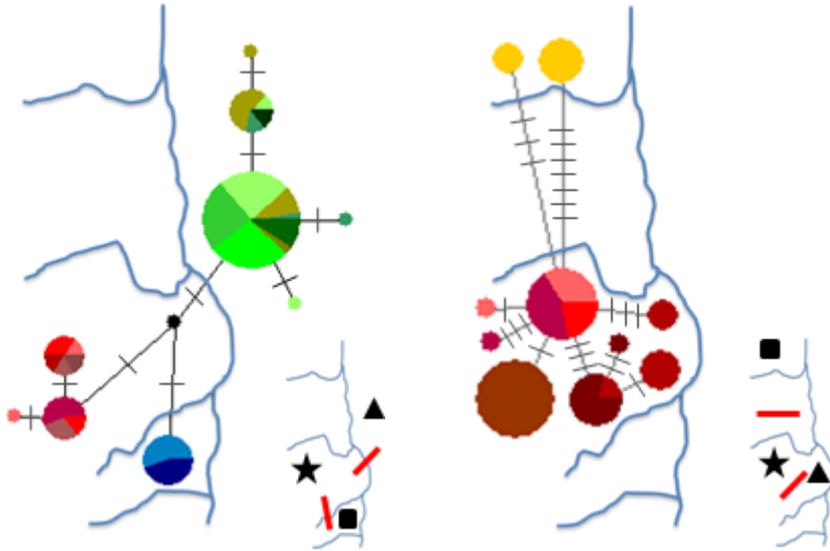
Para *Heterophrynus* Rio Salobra é coincidente com a separação dos MOTUs. H1 ocorre ao leste e H2 ao Oeste do Rio Salobra. A posição da barreira gerada para H2 é coincidente com a posição do Córrego Azul, refletindo a ausência de compartilhamento haplotípico, por populações viventes ao Norte e a Sul do Córrego Azul.

No caso dos Grilos, E2 ocorre somente a Oeste do Rio Salobra, enquanto E1, têm ocorrência para os interfluxos de ambos os rios de superfície. Os três grupos populacionais ( $k=3$ ) obtidos para E1, também, concordam com a falta de compartilhamento haplotípico para as populações viventes em interfluxos contrários. O conjunto de haplótipos presentes em cada interfluxo ramifica-se de um mesmo haplótipo não amostrado (mv), o qual explica o posicionamento da primeira barreira, separando as populações que amostramos à leste e a oeste do Rio Salobra. A segunda barreira é coincidente a posição do Córrego Azul, separando as populações que vivem a Sul e a Norte do Córrego Azul.

*Endecous*

E1

E2



*Heterophrynus*

H1

H2

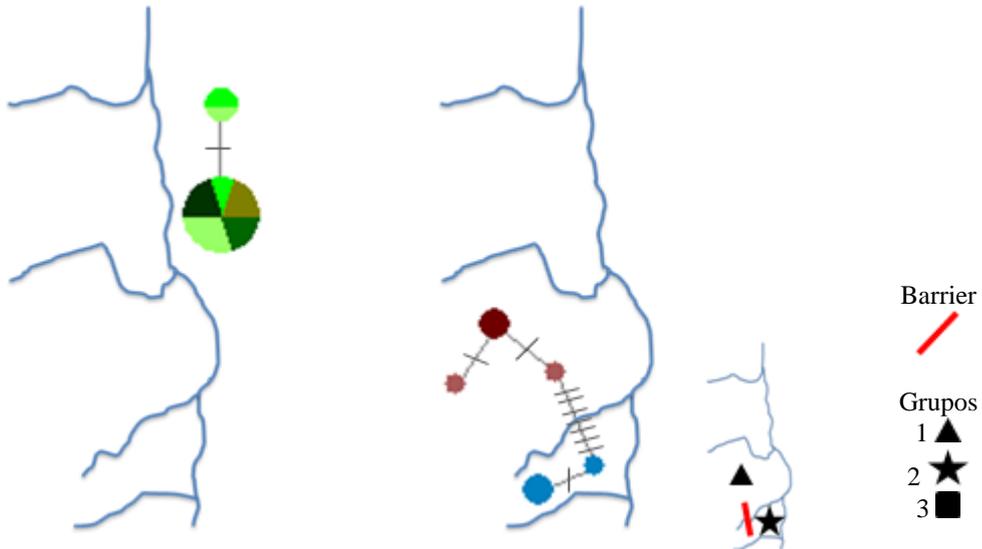


Figura 2. Rede de haplótipos baseada em seqüências de COI i de *Endecous* (E1 e E2) e de *Heterophrynus*, viventes nas 19 cavidades inseridas na Bacia hidrográfica do rio Salobra. Cada círculo representa um haplótipo diferente e o tamanho do círculo é proporcional à sua frequência relativa e as cores são correspondes às cavernas que amostramos. O esquema que acompanha a rede de haplotipo corresponde à posição das barreiras geradas a partir de BARRIER (BARRIER v2. 2), calculada para os MUTUs, com distribuição em ambas margens de um mesmo rio da Bacia hidrográfica do Rio Salobra.

Tabela 2. Resultado de agrupamentos SAMOVA. Minimizando a variação dentro do grupo ( $F_{sc}$ ) e maximizando a variação entre os grupos ( $F_{ct}$ ), calculados para os MUTUs com distribuição em ambas as margens de um mesmo rio da Bacia hidrográfica do Rio Salobra. Programa SAMOVA v1.0. SAMOVA.

Grupos	Composição dos grupos	$F_{st}$	$F_{sc}$	$F_{ct}$
<i>Endecous</i>				
MOTU I				
2	[11, 14-17] [2-10]	0.88076	0.67465	0.63350
<b>3</b>	<b>[11, 14-17] [2-8] [9-10]</b>	0.87064	<b>0.29724</b>	<b>0.81593</b>
4	[9-10] [11, 14-15] [2-8] [16-17]	0.86743	0.25473	0.82211
5	[11, 14-17] [7-8] [9-10] [2-5] [6]	0.83667	0.06901	0.82457
6	[15] [7-8] [16-17] [2-6] [9-10] [11-14]	0.84138	-0.03790	0.84718
MOTU II				
2	[15, 16, 18, 19] [12, 13]	0.66980	0.52955	0.29812
<b>3</b>	<b>[12, 13] [15,16,18] [19]</b>	0.67259	<b>0.26764</b>	<b>0.55294</b>
4	[18] [19] [12-13] [15,16]	0.63340	0.12857	0.57932
5	[18] [12] [13] [19] [15,16]	0.62336	-0.13810	0.66906
<i>Heterophrynus</i>				
MOTU II				
<b>2</b>	<b>[13,17] [9]</b>	0.91392	<b>0.09091</b>	<b>0.90531</b>

A ausência de significância estatística encontrada para  $F_s$ ,  $D$  e  $R_2$  concorda com a ausência de expansão demográfica e espacial que encontramos nas análises de *mismatch distribution* (Tabela 3). A ausência de contato entre populações de interfluxos contrários, também está impressa na ausência de significância estatística entre os grupos SAMOVA, registrados em MIGRATE-N (Tabela 4).

Tabela 3: Sumário estatístico das análises *mismatch distribution* e dos testes de neutralidade calculados para *Endecous* viventes nas 19 cavidades inseridas na Bacia hidrográfica do rio Salobra. Para expansão demográfica e espacial, os testes de Goodness-of-fit estão disponíveis (soma do desvio quadrado / index raggedness Harpenning `s) com indicação para significância, com o seu significado (<sup>NS</sup>= não significativo e \*= significativo,  $p < 0,05$ ). Da mesma forma apresentamos os resultados do teste neutralidade ( $R_2$  = Ramos-Onsins e Rozas`s  $R_2$ ).

	<i>Endecous</i>	
	MOTU I	MOTU II
Expansão demográfica		
Tau	2,318 (0,386-3,583)	3,758 (2,640-6,259)
Goodness-of-fit	0,029 <sup>NS</sup> /0,097 <sup>NS</sup>	0,020 <sup>NS</sup> /0,048 <sup>NS</sup>
Expansão Espacial		
Tau	2,080 (0,556-3,965)	2,7 (0,785-10,288)
Goodness-of-fit	0,019 <sup>NS</sup> /0,097 <sup>NS</sup>	0,019 <sup>NS</sup> /0,048 <sup>NS</sup>
Tajima's D	-0,613 <sup>NS</sup>	-0,864 <sup>NS</sup>
Fu' FS	-1,997 <sup>NS</sup>	0,277 <sup>NS</sup>
$R_2$	0,046 <sup>NS</sup>	0,081 <sup>NS</sup>

Tabela 4: Estimativa de mutação do locus gênico, a partir do tamanho da população  $\theta$  e mutação por taxas de migração  $M$ . As estimativas foram encontradas utilizando o módulo de inferência bayesiana em MIGRATE-N. (<sup>NS</sup>= não significativo e \*= significativo).

Parâmetros	Mode	Media	Intervalo de credibilidade
<i>Endecous</i>			
MOTU I			
$\theta_{\_1}$	0,00130	0,00157	0,00000 - 0,00353*
$\theta_{\_2}$	0,00353	0,00110	0,00000 - 0,00293*
$\theta_{\_3}$	0,00090	0,00130	0,00000 - 0,00333*
$\theta_{\_2-1}$	0,33	203,00	0,00000 - 803,33 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_3-1}$	0,33	184,33	0,00000 - 803,33 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_1-2}$	980,33	610,33	146,67 - 1000,00 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_3-2}$	0,33	376,33	0,00000 - 915,33 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_1-3}$	4,33	314,33	0,00000 - 885,33 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_2-3}$	4,33	306,33	0,00000 - 884,67 <sup>NS</sup>
MOTU II			
$\theta_{\_1}$	0,00523	0,00590	0,00147 - 0,01127*
$\theta_{\_2}$	0,00250	0,00430	0,00000 - 0,01747*
$\theta_{\_2-1}$	0,33	75,00	0,00 - 568,00 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_1-2}$	231,00	383,67	16,67 - 903,33 <sup>NS</sup>
<i>Heterophrynus</i>			
MOTU II			
$\theta_{\_1}$	0,00877	0,01390	0,00200 - 0,04233*
$\theta_{\_2}$	0,00077	0,00143	0,00000 - 0,00413*
$\theta_{\_2-1}$	0,33	28,33	0,00 - 142,67 <sup>NS</sup>
$\theta_{\_1-2}$	2,33	61,67	0,00 - 719,33 <sup>NS</sup>

#### 4. Discussão

Nossos resultados apoiam nossa previsão de que pequenos rios de superfície funcionam como barreiras físicas para MOTUs troglófilos de grilos e de amplipígiolos. Nós não encontramos mudanças significativas nos tamanhos efetivos das populações e também não encontramos sinal de migração de genes entre conjuntos de populações separados por um mesmo rio. Se populações de grilos e de amplipígiolos, ancestralmente contínuas, não tivessem sido isoladas pelos rios, nós esperaríamos encontrar compartilhamento haplotípico por populações de interfluxos contrários (Neigel & Avise 1986; Funk & Omland 2003).

Como hipotetizado por Wallace (1842) a grande maioria dos estudos, utilizando fauna epigial revelam que a composição das populações é diferente em relação à largura do rio, a diferença aumenta, assim, a partir da cabeceira em direção à boca (Colwell 2000). Nossos resultados revelam o papel de barreira exercido por rios superficiais de dimensões tão pequenas quanto as comumente negligenciadas. Mesmo que afluentes tenham sido reconhecidos por atuarem como barreiras para o cruzamento entre indivíduos de populações separadas por um mesmo rio a largura dos afluentes testados são consideravelmente maiores do que a testada por nós. Nós demonstramos que diferentes grupos taxonômicos (grilos e de amplipígiolos) respondem positivamente ao efeito de

barreira exercido por afluentes com menos de 10 metros de largura, como o Córrego Azul (Lefébure *et al.* 2006; Culver 2009; Kornobis 2011). A busca por pontos em comum nas histórias evolutivas de dois ou mais táxons permite encontrar padrões comuns para os processos subjacentes (Bermingham & Moritz 1998; Avise 2000). De acordo com Rosen (1978) e Zink (2000) o reconhecimento de padrões congruentes, nos remete a processos vicariantes, uma vez que, padrões associados à dispersão, geralmente, não são coincidentes.

Há duas evidências que nos permite assumir o papel de rios de superfície na diferenciação genética das populações de grilos e de amplipígiros. A primeira é a congruência que encontramos para os grupos taxonômicos e a segunda é a repetição deste padrão para ambos os cursos d' água. Como sugerido por Porter 2007 e Culver *et al.* (2009), a busca por padrões congruentes, nos permitiu reconhecer o papel de processos vicariante. Para Culver *et al.* (2009) a baixa capacidade de dispersão da fauna cavernícola, refletida nas altas taxas de microendemismo registradas para fauna cavernícola faz com que processos vicariantes, incluindo para pequenas escalas, reflita diretamente na diferenciação genética das populações e no aumento da riqueza de fauna cavernícola. Somado a ausência compartilhamento haplotípico por populações vivendo em interfluxos contrários, está o papel que o Rio Salobra exerce no processo de diversificação. Além de E1 ocorrer apenas a oeste do Rio Salobra, seu efeito de barreira também está refletido no processo de diversificação dos amplipígiros.

Segundo Burney & Brumfield (2009) é essencial considerar aspectos da biologia e ecologia dos organismos para o entendimento de potenciais barreiras ao fluxo gênico. Consideramos que a variação na concentração de traços troglomorfo, cuidados parentais e a locomoção além da sensibilidade à água são os principais fatores que levam os rios que testamos exercerem seu papel de barreira com diferentes intensidades. Com ocorrência restrita à Oeste do Rio Salobra, a grande maioria dos haplotipos de E2 é exclusiva a uma única caverna e este é o MOTU que apresenta maior concentração de traços troglomorfo (total membranização das asas, pequeno tamanho corporal, perda de pigmentação e à redução dos órgãos de visão evidentes) (Christman *et al.* 2005). Assim como registrado para a maioria das cavernas ao redor do mundo, espécies troglóbias ou aquelas que estão em via de adquirirem tal forma estão entre as espécies com maiores taxas de endemismo.

Para os amplipígiros, estes contam com órgãos sensoriais totalmente sensíveis a presença de água, orientando-os a buscar locais mais secos (Weygoldt 2000). Quando

no ambiente subterrâneo, estes predadores são geralmente vistos em paredes e tetos das cavernas. Inversamente a capacidade dos grilos em saltar até 100 vezes o seu tamanho corporal (Whitman 2008) pode contribuir para as menores taxas de diferenciação para os grilos, especialmente quando consideramos o Córrego Azul. Para os amplipígios o territorialismo, centrado nos machos, pode facilitar o compartilhamento haplotípico entre cavidades próximas. As fêmeas carregam os filhotes no dorso de seu abdômen e ao se deslocarem podem deixar suas proles em locais relativamente distantes de sua área territorial, caso isso não aconteça seus filhotes sempre irão procurar locais longe, já que podem se tornar presas de seus progenitores.

Embora previamente hipotetizado por autores que estudaram a fauna subterrânea na região Neotropical (Rivera 2002; Trajano & Bichuette 2010), nosso estudo representa o primeiro trabalho, que testa o papel de sistema hidrológico em pequena escala, como promotor de diversificação em invertebrados terrestres. Considerando que a maioria dos sistemas cavernícolas continentais em formação calcária são moldados pela água doce, nós podemos esperar que os padrões filogeográficos da fauna de cavernas devem ter sido amplamente moldados pela dinâmica de formação dos sistemas de drenagem.

#### 4.3. Implicações dos nossos achados para conservação

Nestes últimos, um dos aspectos mais impressionantes da diversificação em fauna cavernícola, tem sido desvendado recentemente com o uso de ferramentas moleculares (Juan 2010), pois tem permitido detecção de padrões de elevada divergência gênica em pequena escala para grupos crípticos morfologicamente (Lefébure *et al.* 2006; Finston *et al.* 2007). Neste contexto, nosso estudo adiciona evidências de diversificação em pequena escala para fauna cavernícola a orientados por sistema hidrológico. As duas barreiras detectadas em uma escala de geográfica pequena nos permite formular que o Planalto da Bodoquena, com mais de 240 cavernas catalogadas (ICMBio/CECAV) em duas bacias hidrográficas (Bacia do Rio Miranda e do Paraguai), deve abrigar uma elevada diversidade beta ainda pouco conhecida.

É de amplo consenso que o ambiente subterrâneo é frágil e altamente vulnerável a alterações ambientais, em virtude das altas taxas de endemismo, pela sua dependência de nutrientes importados do meio epígeo e por terem populações pequenas e com baixa capacidade de recuperação (Howarth 1981; Trajano 2000). Tais características

permitem ao ambiente subterrâneo ser considerado um *hotspot* de biodiversidade (Culver & Sket 2000; Myers *et al.* 2000) e toda a fauna troglóbia e obrigatoriamente troglóxena, encaixa-se, *a priori*, pelo menos na categoria vulnerável de espécies ameaçadas, proposta pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Trajano & Bichuette 2006).

No Planalto da Bodoquena, como na maioria dos sistemas cavernícolas na região Neotropical, há forte demanda de exploração mineral e turística das cavernas, o que gera riscos à manutenção da diversidade nestas áreas (Lobo *et al.* 2013). Diversos trabalhos prévios têm discutido a importância de se considerar a diversidade de cavernas em estratégias de conservação. Basicamente estes estudos têm focado em diversidade de espécies, principalmente as troglomórficas, usando dados morfológicos. Embora válidos para detectar padrões gerais de distribuição das espécies, estes estudos provavelmente subestimam a diversidade nestes ambientes e, conseqüentemente, podem gerar estratégias de conservação simplistas ou até mesmo equivocadas (Eberhard *et al.* 2005).

Nossos resultados demonstram claramente que mesmo em uma pequena bacia hidrográfica, a diferenciação genética para fauna subterrânea é orientada pelos sistemas hidrográficos. Em nosso caso, as taxas de diferenciação genética de *Endecous* e de *Heterophrynus* foram elevadas, mesmo entre cavernas distanciadas por ~2 km. Isto é crítico para estratégias de conservação, pois indica que devemos considerar variações populacionais em pequena escala não detectáveis em análises apenas de riqueza ou endemismo de espécies, baseadas no conceito de espécie apenas morfológico. Em síntese, sugerimos que projetos de levantamento de fauna em cavernas, estudos de impacto ambiental, estratégias para monitoramento e para a conservação devam considerar dados de variabilidade genética entre as populações.

Agradecimentos: Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela minha bolsa de doutoramento, concedida durante meus quatro anos de doutoramento (Project 483838/2010-1) e pela bolsa de produtividade concedida a meu orientado Fabio de Oliveira Roque (Process 303293/2009-8).

## 5. Referências Bibliográficas

Allegrucci G, Todisco V, Sbordoni V (2005) Molecular phylogeography of *Dolichopoda* cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae): A scenario suggested by mitochondrial DNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, **37**, 153-164.

Allegrucci G, Rampini M, Gratton P, Todisco V, Sbordoni V (2009) Testing phylogenetic hypotheses for reconstructing the evolutionary history of *Dolichopoda* cave crickets in the eastern Mediterranean. *Journal of biogeography*, **36**, 1785-1797.

Allegrucci G, Trucchi E, Sbordoni V (2011) Tempo and mode of species diversification in *Dolichopoda* cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **60**, 108-121.

Alvarenga CJS, Boggiani PC, Babinski M, Dardenne MA, Figueiredo M *et al.* (2011) Glacially influenced sedimentation of Puga Formation, Cuiabá Group and Jacadigo Group, and associated carbonates of Araras and Corumbá groups, Paraguay Belt Brazil. *Journal of the Geological Society (London)*, **36**, 487-497.

Avise JC, Selander RK (1972) Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution*, **26**, 1-19.

Avise JC (1998) Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **265**, 457-463.

Avise JC (2000) *Phylogeography*. Boston, MA: Harvard University Press.

Ayres JM, Clutton-Brock TH (1992) River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist*, **140**, 531-537.

Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 481-491.

Bates JM, Haffer J, Grismer E (2004) Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the Rio Tapajo's, a major Amazonian river. *Journal of Ornithology*, **145**, 199-205.

Berli P, Felsenstein J (1999) Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, **152**, 763-773.

Berli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 4563-4568.

Berli P (2006) Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, **22**, 341-345.

Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367-369.

Burney CW, Brumfield RT (2009) Ecology predicts levels of genetic differentiation in Neotropical birds. *The American Naturalist*, **174**, 358-368.

Caccone A (1985) Gene flow in cave arthropods: a qualitative and quantitative approach. *Evolution* **39**, 1223-1235.

Caccone A, Sbordoni V (2001) Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from bathysciine beetles. *Evolution*, **55**, 122-130.

Christman MC, Culver DC, Madden MK, White D (2005) Patterns of endemism of the eastern North American cave fauna. *Journal of Biogeography*, **32**, 1441-1452.

Colwell RK (2000). A barrier runs through it... or maybe just a river. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 13470-13472.

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

Culver DC, Sket B (2000) Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of cave and Karst studies*, **62**, 11-17.

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

Guzik MT, Cooper S, Humphreys WF, Austin AD (2009). Fine-scale comparative phylogeography of a sympatric sister species triplet of subterranean diving beetles from a single calcrete aquifer in Western Australia. *Molecular Ecology*, **18**, 3683-3698.

DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) A história biogeográfica da Mata Atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: Carvalho CJB, Almeida EAB(eds.). *Biogeografia da América do Sul. Padrões & Processos* (ed.). Editora Roca, São Paulo.

Delaunay B (1934) Sur la sphere vide. *Bulletin Acad Sci USSR*, **7**, 793-800

Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.

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

Eberhard S, Leijns R, Adams MA (2005) Conservation of subterranean biodiversity in Western Australia: using molecular genetics to define spatial and temporal relationships in two species of cave-dwelling Amphipoda. *Subterranean Biology*, **3**, 13-27.

Elias M, Joron M, Willmott k, Silva-Brandão KL, Kaiser V, Arias CF, Gomes Piñeres LM, Uribe S, Brower AVZ, Freitas AVL, Jiggins C (2009) "Out of the Andes: patterns of diversification in clearwing butterflies." *Molecular Ecology* **18**, 1716-1729.

Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, **13**, 853-864.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.1): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, **1**, 47.

Finston TL, Johnson MS, Humphreys WF, Eberhard S, Halse S (2007) Cryptic speciation in two widespread subterranean amphipod genera reflects historical drainage patterns in an ancient landscape. *Molecular Ecology*, **16**, 355-365.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299.

Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.

Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**, 397-423.

Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, **170**, 1261-1280.

Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 708-711.

Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with GENELAND: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, **24**, 1406-1407.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160-174.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society A*, **270**, 313-321.

Hellmayr CE (1910) The birds of the Rio Madeira. *Novitates zoologicae*, **17**, 257-428.

Howarth FG (1981) The conservation of cave invertebrates. In *Proceedings of the First International Cave Management Symposium*. Murray State University Press, Murray, Kentucky.

Ivanova NV, Waard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 998-1002.

Juan C, Guzik MT, Jaume D, Cooper SJ (2010) Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. *Molecular ecology*, **19**, 3865-3880.

Juen L, De Marco JrP (2011) Odonate biodiversity in terra-firme forest streamlets in Central Amazonia: on the relative effects of neutral and niche drivers at small geographical extents. *Insect Conservation and Diversity*, **4**, 1-10.

Juen L, De Marco-Jr P (2012) Dragonfly endemism in the Brazilian Amazon: competing hypotheses for biogeographical patterns. *Biodiversity and Conservation*, **21**, 3507-3521.

Kingman JF (2000) Origins of the coalescent. 1974-1982. *Genetics*, **156**, 1461-1463.

Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP (1983) Optimization by Simulated Annealing. *Science*, **220**, 671-680.

Kornobis E, Pálsson S, Sidorov DA, Holsinger JR, Kristjánsson BK (2011) Molecular taxonomy and phylogenetic affinities of two groundwater amphipods, *Crangonyx islandicus* and *Crymostygius thingvallensis*, endemic to Iceland. *Molecular phylogenetics and evolution*, **58**, 527-539.

Lefébure T, Douady CJ, Gouy M, Trontelj P, Briolay J, Gibert J (2006) Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, **15**, 1797-1806.

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

Lobo HAS, Trajano E, Marinho MDA, Bichuette ME, Scaleante JAB, Scaleante OAF, Rocha BN, Lateza FV (2013) Projection of tourist scenarios onto fragility maps: Framework for determination of provisional tourist carrying capacity in a Brazilian show cave. *Tourism Management*, **35**, 234-243.

Losos JB, Ricklefs RE (2009) "Adaptation and diversification on islands." *Nature*, **457**, 830-836.

Macarthur RH, Wilson EO (1967) *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, 203p

Maldonado-Coelho M, Blake JG, Silveira LF, Batalha-Filho H, Ricklefs RE (2013) Rivers, refuges and population divergence of fire-eye antbirds (*Pyriglena*) in the Amazon Basin. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**, 1090-1107.

Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, **76**, 173-190.

Monmonier MS (1973) Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, **3**, 245-261.

Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533-563.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonesca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.

Neigel JE, Avise JC (1986) Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Karlin S, Nevo E (eds). *Evolutionary Processes and Theory*. Academic Press, Orlando, Florida.

Porter ML (2007) Subterranean biogeography: what have we learned from molecular techniques? *Journal of Cave and Karst Studies*, **69**, 179-186.

Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.

R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Accessed 03 September 2012.

Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092-2100.

Rex MA, McClain CR, Johnson NA, Etter RJ, Allen JA, Bouchet P, Warén A (2005) A Source-Sink Hypothesis for Abyssal Biodiversity. *The American Naturalist*, **165**, 163-178.

Rivera MAJ, Howarth FG, Taiti S, Roderick GK (2002) Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods (Oniscidea: Philosciidae): vicariant speciation or adaptive shifts?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 1-9.

Rosen DE (1978) Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Systematic Zoological*, **27**, 59-88.

Russel WMS, Burch RL (1992) *The Principles of Humane Experimental Techniques*. Special Edition. Universities Federation for Animal Welfare. London: Herts.

Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 1079-1089.

Stein ED, White BP, Mazor RD, Miller PE, Pilgrim EM (2013) Evaluating ethanol-based sample preservation to facilitate use of DNA barcoding in routine freshwater biomonitoring programs using benthic macroinvertebrates. *PloS ONE* 8, e51273.

Surina B, Schneeweiss GM, Glasnović P, Schönswetter P (2014) Testing the efficiency of nested barriers to dispersal in the Mediterranean high mountain plant *Edraianthus graminifolius* (Campanulaceae). *Molecular ecology*, **23**, 2861-2875.

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

Trajano E (2000) Cave faunas in the Atlantic tropical rain forest: composition, ecology and conservation. *Biotropica*, **32**, 882-893.

Trajano E, Bichuete ME (2006) *Biologia Subterrânea*. 1. ed. São Paulo: Redespeleo Brasil.

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

UNESCO (2009) <http://www.unesco.org/science/earth/geoparks.shtml> (acessado em janeiro de 2009).

Wallace AR (1852) On the monkeys of the Amazon. *Proceeding Of Zoological Society London*, **20**, 107-110.

Weygoldt P (2000) *Whip spiders (Chelicerata: Amblypygi): their biology, morphology and systematics*. Apollo Books, Stenstrup, Denmark.

Whitman DW (2008) The significance of body size in the Orthoptera: a review. *Journal of Orthoptera Research*, **17**, 117-134.

Wilme L, Goodman SM, Ganzhorn JU (2006) Biogeographic evolution of Madagascar's microendemic biota. *Science*, **312**, 1063-1065.

Zink RM, Blackwell-Rago RC, Ronquist F (2000) The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **267**, 497-503.