



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA

FAUNA SUBTERRÂNEA DE COLLEMBOLA NO OESTE POTIGUAR: DIVERSIDADE
CRÍPTICA E NOVAS ESPÉCIES

AGOSTO, 2025
JOÃO PESSOA, PB

PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA

FAUNA SUBTERRÂNEA DE COLLEMBOLA NO OESTE POTIGUAR: DIVERSIDADE
CRÍPTICA E NOVAS ESPÉCIES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Zeppelini Filho

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Cavalcante Bellini

Segundo Orientador: Prof. Dr. Ricardo Koroiva

AGOSTO, 2025
JOÃO PESSOA, PB

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729f Souza, Paolla Gabryelle Cavalcante de.
Fauna subterrânea de Collembola no Oeste Potiguar :
diversidade críptica e novas espécies / Paolla
Gabryelle Cavalcante de Souza. - João Pessoa, 2025.
111 f. : il.

Orientação: Douglas Zeppelini Filho.
Coorientador: Bruno Cavalcante Bellini,
Coorientador: Ricardo Koroiva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Collembola. 2. Paronellinae. 3. Filogeografia. 4.
Mitogenoma. 5. Taxonomia. I. Zeppelini Filho, Douglas.
II. Cavalcante Bellini, Bruno. III. Koroiva, Ricardo.
IV. Título.

UFPB/BC

CDU 595.76:591.4(043)

PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA

FAUNA SUBTERRÂNEA DE COLLEMBOLA NO OESTE POTIGUAR: DIVERSIDADE
CRÍPTICA E NOVAS ESPÉCIES

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

João Pessoa, 12 de Agosto de 2025.

Dr. Douglas Zeppelini Filho (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba

Dra. Anamaria Dal Molin (Avaliadora)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dr. Aila Soares Ferreira (Avaliadora)
Universidade Estadual da Paraíba

Dr. Alexandre Pereira Colavite (Avaliador)
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Diego de Medeiros Bento (Avaliador)
Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas - ICMBio/CECAV

**Ata da 179ª Apresentação e Banca de Defesa
de Doutorado de Paolla Gabryelle
Cavalcante de Souza**

Ao(s) doze dias do mês de agosto de dois mil e vinte e cinco, às 15:00 horas, no(a) ambiente virtual, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se, em caráter de solenidade pública, membros da banca examinadora para avaliar a tese de doutorado de **Paolla Gabryelle Cavalcante de Souza**, candidato(a) ao grau de Doutor(a) em Ciências Biológicas. A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros: **Dr. Douglas Zeppelini Filho (Orientador-UEPB/PB); Dra. Anamaria Dal Molin (UFRN/RN); Dra. Aila Soares Ferreira (IBS-UEPB/PB); Dr. Alexandre Pereira Colavite (UFPB/PB); Dr. Diego de Medeiros Bento (ICMBio - CECAV)**. Compareceram à solenidade, além do(a) candidato(a) e membros da banca examinadora, alunos e professores do PPGCB. Dando início à sessão, a coordenação fez a abertura dos trabalhos, apresentando o(a) discente e os membros da banca. Foi passada a palavra ao(a) orientador(a), para que assumisse a posição de presidente da sessão. A partir de então, o(a) presidente, após declarar o objeto da solenidade, concedeu a palavra a **Paolla Gabryelle Cavalcante de Souza**, para que dissertasse, oral e sucintamente, a respeito de seu trabalho intitulado **“FAUNA SUBTERRÂNEA DE COLLEMBOLA NO OESTE POTIGUAR: DIVERSIDADE CRÍPTICA E NOVAS ESPÉCIES”**. Passando então a discorrer sobre o aludido tema, dentro do prazo legal, o(a) candidato(a) foi a seguir arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a Comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **Aprovada**. Perante o resultado proclamado, os documentos da banca foram preparados para trâmites seguintes. Encerrados os trabalhos, nada mais havendo a tratar, eu, orientador(a), como presidente, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Documento assinado digitalmente
gov.br DOUGLAS ZEPPELINI FILHO
Data: 12/08/2025 19:01:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

João Pessoa, 12/08/2025.

Orientador(a)

Examinador(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANAMARIA DAL MOLIN
Data: 12/08/2025 21:10:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Exami

Examinador(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br DIEGO DE MEDEIROS BENTO
Data: 12/08/2025 21:14:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador(a)

Paolla Gabryelle Cavalcante de Souza

Documento assinado digitalmente
gov.br PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA
Data: 14/08/2025 03:52:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(discente ciente do resultado)

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio a Pesquisa da Paraíba. Este trabalho só foi possível devido ao apoio financeiro.

Ao programa de mobilidade internacional do LabEx-CEMEB, apoiado pela Agência Nacional de Pesquisa da França, que financiou minha estadia e meus estudos no Département de Biologie Ecologie Environnement do Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive associada a Université Paul-Valéry – Montpellier III.

Ao Bruno Bellini, amigo e orientador, pelo apoio durante toda essa jornada acadêmica, que se iniciou na graduação e, agora, estamos fechando um ciclo.

Ao Ricardo Koroiva que tive a sorte de conhecer durante a seleção de doutorado e foi determinante para minha formação no mundo das “moleculoides”.

Ao Jérôme Cortet, meu supervisor durante a estadia na França, que me acolheu em seu laboratório, sempre foi simpático e gentil. Obrigada pelo apoio e pela ajuda com as conexões acadêmicas. Um agradecimento especial ao Christoph, a Marie-Pierre e ao François que me auxiliaram durante as análises moleculares.

Ao Douglas Zeppelini, por me aceitar como sua orientanda de doutorado, mesmo em meio aos desafios e incertezas do ano pandêmico de 2021.

Ao Troglobento, Diego Bento, por ter me incentivado nessa aventura de trabalhar com cavernas; ao Iatagan e ao Estevam, por toda ajuda durante as coletas nas cavernas. Agradeço imensamente a contribuição de todos que me ajudaram nesta etapa.

Ao Angelo Marcelino, por caminhar junto comigo em todas as etapas deste processo e por emprestar seu computador para as análises de mitogenoma. Muito obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório de Collembola, que apesar de distante no último ano, continuarão sendo sempre boas companhias para fofocar e descontraír em momentos fáceis ou difíceis.

A minha família, pelo incentivo e apoio, que às vezes, mesmo sem compreender o que estava fazendo, respeitavam e me ajudaram para que eu possa finalizar este doutorado.

Aos amigos da pós-graduação que fiz ao longo dessa jornada, em especial, João Paulo, Aninha, Amanda, Érica, Silvi, Sara e Rozzana. A Zoologia de Campo foi mais especial com vocês.

E, por fim, aos animais das cavernas, deixo minhas sinceras desculpas por qualquer impacto que a coleta tenha causado em seu habitat.

RESUMO

A taxonomia integrativa é essencial para identificar e reclassificar táxons de Collembola que são morfológicamente parecidos. Animais que habitam cavernas estão sujeitos a pressões seletivas semelhantes e podem apresentar características morfológicas parecidas entre si, como redução de olhos e pigmentação e alongamento de apêndices. O gênero *Trogolaphysa* (Entomobryidae, Paronellinae) possui 24 espécies registradas para o Brasil e está amplamente distribuído em cavernas da região semiárida do Rio Grande do Norte (RN). O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies distribuídas em cavernas da região mesoeste do RN, sua distribuição, delimitação e história evolutiva, através da integração de dados morfológicos e moleculares, e, se necessário, descrevê-las. Uma espécie de *Trogolaphysa* encontrada nas cavernas do RN, que se assemelhava a *Lepidonella zeppelinii*, foi reavaliada. Após a reanálise do material tipo de *L. zeppelinii*, a espécie foi redescrita e transferida para o gênero *Trogolaphysa*, sendo renomeada como *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. O conjunto de dados com 32 sequências parciais de Citocromo Oxidase I (COX1) de *T. zeppelinii* comb. nov. foi utilizado em árvores filongéticas de máxima verossimilhança, inferência Bayesiana e métodos de delimitação de espécies. Cinco linhagens de *T. zeppelinii* comb. nov. foram delimitadas, sendo duas linhagens com valores de suporte absoluto e morfologias semelhantes. A distância genética, análises populacionais e teste de Mantel confirmam a distinção entre as populações do norte e do sul da área estudada. No entanto, a falta de diferenças morfológicas evidentes impede que essas populações sejam classificadas como espécies distintas. Foi também realizada a extração e o sequenciamento do mitogenoma de *T. zeppelinii* comb. nov., apresentado o seu mitogenoma completo e árvore filogenética baseada em genes codificadores de proteínas para verificar o seu posicionamento filogenético entre os Entomobryoidea. Seu mitogenoma possui 14.822 pares de base, contendo 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes ribossomais transportadores e dois genes ribossômicos. A análise filogenética confirmou que a espécie está em um clado monofilético de *Trogolaphysa* dentro de Paronellinae, relacionada a *Troglopedetes* e *Cyphoderus*. Análises filogenéticas com mitogenomas de espécies Neotropicais é importante para melhor compreensão das relações entre os gêneros de Paronellinae. Por fim, foram descritas duas novas espécies de Collembola coletadas em cavernas na região semiárida do Rio Grande do Norte, *Cyphoderus caatinguensis* sp. nov. e *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. A espécie *C. caatinguensis* sp. nov. distingue-se pela combinação de sua quetotaxia labial, úngues com

dente apical filamentoso e o número de cerdas plumosas na face dorsal do dens. Já *P. iataganii* sp. nov. difere das demais espécies do gênero pelo número de subsegmentos do quarto antenômero, número de espinhos cefálicos, quetotaxia do manúbrio e a fórmula ventral do dens. Ambas exibem traços troglomórficos, como a redução de pigmentação e olhos, e sua descrição contribui para o entendimento da fauna neotropical subterrânea e fornece subsídios para futuras políticas de conservação das cavernas do estado do Rio Grande do Norte. Este trabalho evidencia complexidade da diversidade genética de colêmbolos em ecossistemas cavernícolas, reforçando a necessidade de abordagens taxnômicas integrativas.

Palavras-chave: Paronellinae, filogeografia, delimitação de espécies, mitogenoma, taxonomia.

ABSTRACT

Integrative taxonomy is essential for identifying and reclassifying Collembola taxa that are morphologically similar. Animals inhabiting caves are subject to similar selective pressures and may exhibit comparable morphological traits, such as reduced eyes and pigmentation, as well as elongated appendages. The genus *Trogolaphysa* (Entomobryidae, Paronellinae) includes 24 species recorded in Brazil and is widely distributed in caves of the semi-arid region of Rio Grande do Norte (RN). The aim of this study was to identify the species occurring in caves of the midwestern region of RN, their distribution, delimitation, and evolutionary history, through the integration of morphological and molecular data, and, if necessary, to describe them. A species of *Trogolaphysa* found in RN caves, resembling *Lepidonella zeppelinii*, was re-evaluated. After reanalysis of the type material of *L. zeppelinii*, the species was redescribed and transferred to the genus *Trogolaphysa*, being renamed *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. A dataset of 32 partial sequences of Cytochrome Oxidase I (COX1) of *T. zeppelinii* comb. nov. was used in maximum likelihood and Bayesian inference phylogenetic trees, as well as species delimitation methods. Five lineages of *T. zeppelinii* comb. nov. were delimited, with two lineages showing absolute support values and similar morphologies. Genetic distance, population analyses, and Mantel tests confirmed the distinction between populations from the northern and southern parts of the studied area. However, the lack of evident morphological differences prevents these populations from being classified as distinct species. Additionally, the extraction and sequencing of the mitogenome of *T. zeppelinii* comb. nov. were carried out, presenting its complete mitogenome and a phylogenetic tree based on protein-coding genes to verify its phylogenetic placement among Entomobryoidea. Its mitogenome comprises 14,822 base pairs, containing 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, and two ribosomal RNA genes. Phylogenetic analysis confirmed that the species belongs to a monophyletic clade of *Trogolaphysa* within Paronellinae, related to *Troglopedetes* and *Cyphoderus*. Phylogenetic analyses with mitogenomes of Neotropical species are important for a better understanding of relationships among genera of Paronellinae. Finally, two new species of Collembola collected in caves of the semi-arid region of Rio Grande do Norte were described: *Cyphoderus caatinguensis* sp. nov. and *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. *C. caatinguensis* sp. nov. is distinguished by the combination of its labial chaetotaxy, claws with filamentous apical tooth, and the number of plumose setae on the dorsal side of the dens. *P. iataganii* sp. nov., in turn, differs from other species of the genus by the number of subsegments in the fourth antennomere, the number of cephalic spines, the chaetotaxy of the manubrium, and the ventral

formula of the dens. Both species display troglomorphic traits, such as reduced pigmentation and eyes, and their description contributes to the understanding of Neotropical subterranean fauna and provides support for future conservation policies for caves in the state of Rio Grande do Norte. This study highlights the complexity of the genetic diversity of collembolans in cave ecosystems, reinforcing the need for integrative taxonomic approaches.

Keywords: Paronellinae, phylogeography, species delimitation, mitogenome, taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia geral de um espécime de <i>Trogolaphysa</i> (Paronellinae, Entomobryidae, Entomobryomorpha).....	19
Figura 2. Comparação entre espécies de <i>Trogolaphysa</i> edáficas (A–D); e cavernícolas (E–F). A–D, diferentes padrões de pigmentação e tamanhos de apêndices das espécies: A, <i>T. ernesti</i> Cipola & Bellini, 2017; B, <i>T. piracurucaensis</i> NUNES & BELLINI, 2018; C, <i>T. nigrolineata</i> CIPOLA & BELLINI, 2022; D, <i>T. judithnajtae</i> NGUYEN & SOTO-ADAMES, 2018. E, Habitus de espécie cavernícola de <i>Trogolaphysa</i> sp. com redução de pigmentação. F, Espécie hipógea <i>Trogolaphysa jacobyi</i> SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013 com redução de pigmentação ocular e alongamento de antenas (figuras adaptadas de SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013; CIPOLA & BELLINI, 2017; SOTO-ADAMES & NGUYEN, 2018; NUNES & BELLINI, 2018; CIPOLA & BELLINI, 2022; ZEPPELINI <i>et al.</i> , 2022).....	20
Figura 3. Mapa da distribuição das espécies de <i>Trogolaphysa</i> no globo. Pontos vermelho no mapa representam a localização de espécies de <i>Trogolaphysa</i>	21

Capítulo 1 – Diversidade críptica de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (Entomobryidae, Collembola) em cavernas do seminário brasileiro.

Figura 1. Mapa de distribuição das cavernas inventariadas na região oeste do Rio Grande do Norte.	29
Figura 2. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança utilizando 32 sequências de COX1 de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. e três espécies próximas de Entomobryidae como grupo externo. (A) Barras verticais representam as delimitações das OTUs pelos métodos ASAP, mPTP, PTP/bPTP, ABGD e GMYC. Nós da filogenia com valores de <i>bootstrap</i> (ML) e probabilidade posterior (BI), respectivamente; *valor de <i>bootstrap</i> não apresentado. Abreviações para os nomes das cavernas apresentada na Tabela 2.	37
Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em marcadores nucleares de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. e três espécies próximas de Entomobryidae como grupo externo. (A) Árvore filogenética com 20 sequências de 18s. (B) Árvore filogenética com 10 sequências de 28s. Nós das filogenias com valores de <i>bootstrap</i> . Legendas para os nomes das cavernas apresentada na Tabela 2.	39
Figura 4. Rede de haplótipos e distribuição das localidades das populações de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. baseado no marcador mitocondrial COX1.	40
Figura 5. Árvore consenso ultramétrica das linhagens de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. com idade média estimada baseada na taxa de mutação mitocondrial para Hexapoda. Nós com valores de 95% HPD e variação da idade média para separação das linhagens.....	41
Figura 6. Habitus de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. em álcool. (A) espécime da caverna Furna Feia; (B) espécime da caverna Urubu.	43
Figura 7. Caracteres morfológicos de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. sp. A–B, Ant. IV dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. C–D, Ant. III dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. E–F, Ant. II dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. G–H, Cerdas pre-labrais dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. I–J, Espinhos labrais dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. K–L, Papila E dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. M–N, lobo maxilar externo dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. O–P, Cerdas labiais dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. Q–R, Quetotaxia ventral da cabeça dos morfótipos 1 e 2, respectivamente.	47
Figura 8. Caracteres morfológicos de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. A–F, Quetotaxia dorsal da cabeça e tronco do morfótipo 1. G–L, Quetotaxia dorsal da cabeça e tronco do morfótipo 2.	48

Figura 9. Caracteres morfológicos de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. A–B , Abd. IV e V do morfótipo 1. C–D , Abd. IV e V do morfótipo 2.....	49
Figura 10. Apêndices de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. A–B , Órgão trocanteral dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. C–D , Complexo empodial dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. E–F , Colóforo anterior dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. G–H , Lateral flap dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. I–J , Placa manubrial dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. K–L , Mucro e espinhos do dente da fúrcula dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. *cerda lisa ou ciliada.	50

Capítulo 2 – Mitogenoma completo e posição filogenética de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (Entomobryidae, Collembola)

Figura 1. Representação circular do mitogenoma de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. O círculo interno demonstra a cobertura das reads e o círculo mais externo apresenta os genes (em verde), rRNA (laranja) e os tRNA (em vermelho).	71
Figura 2. Posicionamento filogenético de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. dentro de Paronellinae em uma filogenia de Entomobryidae. Os números nos nós representam os valores de <i>bootstrap</i> ultrarrápido e o suporte SH-aLRT, respectivamente, para a análise de ML baseada em nucleotídeos.	74
Figura 3. Posicionamento filogenético de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. dentro de Paronellinae em uma filogenia de Entomobryidae. Os números dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i> e o suporte SH-aLRT, respectivamente, para a análise de ML baseada em aminoácidos.	75

Capítulo 3 – Novas espécies de *Cyphoderus* Nicolet e *Pararrhopalites* Bonet & Telez (Hexapoda, Collembola) do bioma Caatinga, Brasil

FIGURE 1. Distribution of the sampled caves: A , Map of Brazil marking Rio Grande do Norte state and the sampled municipalities; B , Baraúna municipality, the blue circle marks the location of Furna Nova Cave inside Furna Feia National Park (delimited by the black line), the type locality of <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. ; C , Felipe Guerra municipality, the white circle marks the location of Boa Cave within a semiarid forest, the type locality of <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. D , Furna Nova cave first hall near to the entrance, the specimens of <i>P. iataganii</i> sp. nov. were found in the dark zone of this cave, which was much darker than it appears in the image; E , Boa cave, the image displays piles of guano near to the speleologists, depicting one of the regions of the cave sections, where the specimens of <i>C. caatinguensis</i> sp. nov. were collected.	83
FIGURE 2. Main symbols of the morphological structures used in the descriptions of <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. and <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov.	84
FIGURE 3. <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. head: A , Dorsal view of the left antenna chaetotaxy; B , Clypeal, pre-labral and labral chaetotaxy; C , Mandibles; D , Labial palp papillae with proximal chaetae (lpc) (right side), lateral process (lp.) surpassing the papilla E; E , Maxillary outer lobe and sublobal plate (left side); F , Basal labial and post-labial chaetotaxy with basal chaetae (b.c.); G , Dorsal head chaetotaxy.	88
FIGURE 4. <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. dorsal trunk chaetotaxy, right side: A , Th. II; B , Th. III; C , Abd. I; D , Abd. II; E , Abd. III. Abbreviations: ms = microsensillum, al = anterolateral sensillum, as = anterosubmedial sensillum.	89
FIGURE 5. <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. dorsal trunk chaetotaxy, right side (cont.): A , Abd. IV; B , Abd. V.	90
FIGURE 6. <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. legs: A , Trochanteral organ spine-like chaetae; B , Trochanteral organ (white arrow) and femur III (black arrow) with smooth spine-	

like chaetae; C , Tibiotarsus III internal mac with abruptly pointed apex (black arrow); D , Foot complex III, anterior view; E–F , Ungues II (E) and III (F), respectively, black arrows mark the medial and apical teeth. Abbreviations: b.a. = basal anterior tooth, b.p. = basal posterior tooth, m.t. = unpaired median tooth, a.t. = unpaired apical tooth, a.e. = anteroexternal lamella; a.i. = posteroexternal lamella; p.e. = anterointernal lamella; p.i. = posterointernal lamella.	91
FIGURE 7. <i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. abdominal appendages: A , Collophore anterior side; B , Collophore posterior side; C , Collophore lateral flap; D , Distal part of manubrium and dorsal dens chaetotaxy of dens, dorsal side. E , Mucro and dens with distal feathered chaetae; F , Mucronal teeth in detail, ‘*’ marks the apical smooth chaeta.....	92
FIGURE 8. <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. live specimen in its natural habitat. Photograph by Diego Bento (2021).	93
FIGURE 9. <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. head: A , Right Ant. IV, dorsal view, in detail the apical curved chaeta and sensillum; B , Left Ant. III, ventral view, black arrow marks the lateral short sensillum; C , Dorsal view of the left Ant. I–II, black arrows mark the spine-like chaetae; D , Anterior head chaetotaxy and eyes, white arrow marks a chaeta which can be absent; E , Ventral head, right side, with labial basomedial and basolateral labial chaetae and post-labial region; F , Labral chaetotaxy; G , Labial palp, left side; H , Maxillary outer lobe and sublobal plate (right side); I , apical teeth of the mandibles; J , Maxilla capitulum, right side.	97
FIGURE 10. <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. trunk lateral view: A , Large abdomen chaetotaxy of a female; B , Dorsal spines of the posterior male large abdomen; C , Female anal valves chaetotaxy, ‘*’ mark unpaired chaetae; D , Male anal valves chaetotaxy, ‘*’ mark unpaired chaetae E , Female genital plate; F , Male genital plate.....	98
FIGURE 11. <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. legs: A , Epicoxa to femur of leg I; B , Epicoxa to femur of leg II (arrows indicate chaetae present or absent); C , Epicoxa to femur of leg III (arrows indicates oval organ present or absent); D , tibiotarsus I; E , tibiotarsus II; F , tibiotarsus III.	100
FIGURE 12. <i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. trunk appendages: A–C , Foot complex I–III; D , Manubrium, dorso-lateral view; E , Dens, dorsal chaetotaxy; F , Dens, ventral chaetotaxy of the dens. G , Mucro, external view.....	100

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Diversidade críptica de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (Entomobryidae, Collembola) em cavernas do seminário brasileiro.

Tabela 1. Localização das cavernas inventariadas e lajedos em que estão inseridas no Rio Grande do Norte, Brasil.	28
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para amplificação do material genético dos indivíduos de <i>Trogolaphysa</i> das cavernas da região estudada.	32
Tabela 3. Informações sobre as cavidades inventariadas e identificação.	34
Tabela 4. Detalhes sobre a identificação morfológica e tamanho dos marcadores moleculares das diferentes populações de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. amostradas no estudo.	36
Tabela 5. Distância genética média intrapopulacional (diagonal principal) e interpopulacional de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. baseado no marcador COX1.	36
Tabela 6. Teste de análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar quanto da variação genética observada nas sequências do COX1 de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. pode ser explicada de acordo com a localização das cavernas ao Norte e ao Sul da área inventariada.	38

Capítulo 2 – Mitogenoma completo e posição filogenética de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (Entomobryidae, Collembola)

Tabela 1. Modelo evolutivo para cada gene utilizado na reconstrução das árvores de máxima verossimilhança.	69
Tabela 2. Lista de espécies utilizadas nas análises de mitogenoma com suas respectivas informações taxonômicas, de depósito e referências. O novo mitogenoma está marcado em negrito.	70
Tabela 3. Descrição do mitogenoma de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov.	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Cavidades Naturais Subterrâneas.....	16
1.2 Fauna das cavernas do Rio Grande do Norte.....	17
1.3 Colêmbolos de ambientes subterrâneos	17
1.4 Gênero <i>Trogolaphysa</i>	18
1.5 Taxonomia integrativa em Collembola.....	22
1.6 Ameaças à fauna subterrânea.....	22
2 OBJETIVO GERAL	24
2.1 Objetivos específicos	24
Capítulo 1 - Diversidade críptica de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> (Soto-Adames & Bellini, 2015) comb. nov. (Entomobryidae, Collembola) em cavernas do seminário brasileiro...	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 METODOLOGIA.....	27
2.1 Origem do material biológico	27
2.3 Identificação e descrição do material biológico.....	30
2.4 Extração, amplificação (PCR) e sequenciamento do DNA	30
2.5 Análises filogenéticas	32
2.6 Distância genética e delimitação de espécies.....	33
2.7 Análise de diversidade genética e haplotípica	34
2.8 Critério de validação de espécies	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Análises moleculares das populações de <i>Trogolaphysa</i> amostradas	35
4.2 Redescrição de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov.	41
5 DISCUSSÃO	52
5.1 Taxonomia integrativa para validação de espécies.....	52
5.2 Avaliação do risco de extinção	55
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	57
Capítulo 2 – Mitogenoma completo e posição filogenética de <i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov. (Entomobryidae, Collembola).....	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 METODOLOGIA.....	67
2.1 Extração e construção de bibliotecas de genoma mitocondrial	67
2.2 Montagem e anotação de mitogenomas	67
2.3 Extração de loci	68

2.4 Alinhamento de loci e edição (<i>trimming</i>)	68
2.5 Construção de matrizes para análise filogenética	68
3 RESULTADOS	71
4 DISCUSSÃO	76
5 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	77
Capítulo 3 – Novas espécies de <i>Cyphoderus</i> Nicolet e <i>Pararrhopalites</i> Bonet & Telez (Hexapoda, Collembola) do bioma Caatinga, Brasil	79
Introduction	80
Materials and methods.....	81
Taxonomy.....	84
<i>Cyphoderus caatinguensis</i> sp. nov. Souza, Bellini & Zeppelini.....	84
<i>Pararrhopalites iataganii</i> sp. nov. Souza, Medeiros & Zeppelini.....	93
Discussion	100
Acknowledgements	101
References.....	101
3 CONCLUSÕES FINAIS	107
REFERÊNCIAS	107

*Capítulo publicado e formatado conforme regras da revista *Zootaxa*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Cavidades Naturais Subterrâneas

As cavidades naturais subterrâneas, também conhecidas como cavernas, são espaços no subsolo acessíveis para o homem, formados em rocha maciça por meio de processos naturais (BRASIL, 1990; BRASIL, 2008). Esta definição garante sua proteção legal, bem como o conteúdo mineral, hídrico, faunístico e a florístico associado a elas (BRASIL, 2008; BRASIL, 1990). As cavernas geralmente estão presentes em terrenos cársticos, ou seja, áreas litológicas com predominância de rochas solúveis, como calcita, halita ou sal (NaCl), gipsita, anidrita e dolomita (CECAV/ICMBIO, 2013). Essas cavidades podem ser constituídas por sistemas complexos de canais horizontais e verticais onde a ação da água progressivamente dissolve a rocha matriz (CECAV/ICMBIO, 2019).

A maioria das cavernas no Brasil desenvolve-se em rochas carbonáticas, o que confere ao país um grande potencial espeleológico, visto que cerca de 5% do território é ocupado por carste carbonático (CECAV/ICMBIO 2013). Na região Nordeste, os afloramentos calcários do Grupo Apodi, localizado na Bacia Potiguar, estende-se pelos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará (CECAV/ICMBIO, 2013; ANGELIM, 2006). Essa formação geológica é composta principalmente por rochas carbonáticas, como calcários e dolomitos, e apresenta uma alta concentração de cavidades naturais.

O Grupo Apodi desempenha um papel relevante tanto na economia quanto no armazenamento de recursos hídricos da região. Sua importância econômica está associada à utilização de sua riqueza mineral como matéria-prima em indústrias, especialmente as de cimento e cal. Além disso, devido às características das formações carbonáticas, a região possui boa permeabilidade e porosidade, favorecendo o armazenamento e a circulação de água subterrânea (ANGELIM, 2006).

O Rio Grande do Norte (RN) é a quarta unidade federativa do Brasil com a maior quantidade de cavidades conhecidas, 1.424 cavernas (CANIE, 2025). A maioria destas cavernas está inserida na Formação Jandaíra, que é composta por rochas carbonáticas depositadas em um ambiente marinho durante o Cretáceo Superior (ANGELIM, 2006). As cavernas desta região geralmente estão localizadas nos afloramentos calcários, também conhecidos como lajedos, e os mais conhecidos desta região estão situados na Bacia do Rio Apodi-Mossoró, como o Lajedo Soledade, que possui importância histórica devido às pinturas rupestres e sítios arqueológicos (PORPINO *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2016).

A Chapada do Apodi, no oeste do Rio Grande do Norte, passou por sucessivos eventos climáticos recentes de seca, que marcaram a entrada no estágio Megalaiano, cerca de 4.200 anos atrás (DE OLIVEIRA, 1999; UTIDA *et al.*, 2020). Durante esse período, a vegetação da Chapada do Apodi se tornou mais aberta, típica do bioma Caatinga, e houve o declínio na produção de solo acima dos sistemas cavernícolas (UTIDA *et al.*, 2020). Esses eventos, associados com o estabelecimento da forte sazonalidade vista na Caatinga, tornaram suas cavernas potenciais refúgios para populações de invertebrados de solo, especialmente de espécies dependentes de maior umidade e temperaturas mais estáveis (BENTO *et al.*, 2021).

1.2 Fauna das cavernas do Rio Grande do Norte

As cavidades naturais subterrâneas apresentam uma diversidade de formas e tamanhos que são acessíveis por várias espécies de animais. Estes podem ser classificados quanto a sua permanência e ciclo de vida associados às cavernas. Assim, animais troglóbios estão restritos ao interior das cavernas e outros habitats subterrâneos, e a reprodução e o desenvolvimento destes ocorrem exclusivamente no ambiente subterrâneo. Animais troglófilos são aqueles capazes de se reproduzir e completar seu ciclo de vida tanto no ambiente hipógeo quanto epígeo (externo à caverna). E, por fim, os animais troglótenos são aqueles que utilizam a caverna apenas como abrigo, ou espaço de reprodução ou alimentação, mas dependem diretamente de incursões a ambientes epígeos para completar seu ciclo de vida (BARR & HOLSINGER, 1985; TRAJANO & BESSI, 2017).

As cavernas do Rio Grande do Norte abrigam diversas espécies de animais, dentre elas estão morcegos hematófagos (*Diphylla ecaudata* Spix e *Desmodus rotundus* (Geoffroy Saint-Hilaire)), frugívoros (*Artibeus planirostris* (Spix)) e omnívoros (*Phyllostomus discolor* Wagner), além de invertebrados terrestres, como o hemíptero *Kinnapotiuguara troglobia* Hoch & Ferreira e o quilópode *Newportia potiguar* Ázara & Ferreira, e aquáticos, como os anfípodas *Seborgia potiguar* Fisér, Zagmajster & Ferreira e *Potiberaba porakuara* Fisér, Zagmajster & Ferreira. Muitos desses invertebrados, especialmente aqueles adaptados ao ambiente hipógeo, encontram nas cavernas refúgios seguros contra as condições ambientais extremas da superfície, como variações bruscas de temperatura e a seca sazonal, características marcantes da região semiárida (BENTO *et al.* 2016; BENTO *et al.* 2021).

1.3 Colêmbolos de ambientes subterrâneos

Colêmbolos são microartrópodes frequentemente encontrados em habitats subterrâneos e, nestes ambientes, sua abundância pode ser fator determinante para a

manutenção de cadeias tróficas, uma vez que são alimento para diversos outros invertebrados (LUKIĆ, 2019). Eles são também encontrados comumente no solo, e são importantes para a ciclagem de carbono e nitrogênio através da decomposição da serapilheira, contribuindo para fertilidade nos ambientes edáficos (HOPKIN, 1997; POTAPOV *et al.*, 2023). Colêmbolos possuem uma ampla variedade morfológica, e sua aparência pode ser alongada, como nas ordens Entomobryomorpha e Poduromorpha, ou globular, como nos Symphypleona e Neelipleona.

Entomobryomorpha é a ordem mais representativa de Collembola em ambientes subterrâneos (LUKIĆ, 2019), e sua maior superfamília, Entomobryoidea, agrupa mais de 20% da riqueza taxonômica de todos os colêmbolos (BELLINGER *et al.*, 1996–2024). Entomobryidae *sensu* GODEIRO *et al.* (2023) é a família mais expressiva deste táxon, abrigando subfamílias como Lepidocyrtinae, Entomobryinae e Paronellinae, com diversos gêneros troglófilos tais como *Coecobrya* YOSII, 1956, *Pseudosinella* SCHÄFFER 1897, *Trogolaphysa* MILLS, 1938, *Cyphoderus* NICOLET, 1842 e *Troglobius* PALACIOS-VARGAS & WILSON, 1990 (BELLINGER *et al.*, 1996–2024; PALACIOS-VARGAS, 2002).

A maioria dos colêmbolos listados no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção e na Portaria nº 148 do Ministério do Meio Ambiente de 7 de junho de 2022 são troglóbios. Geralmente suas populações são entendidas como vulneráveis ou ameaçadas, pois sua distribuição é restrita a uma ou poucas cavernas. Nesta lista, existem pelo menos 8 espécies de Collembola que estão criticamente em perigo, por exemplo, as espécie *Trogolaphysa aelleni* YOSII, 1988 e *Troglobius brasiliensis* PALACIOS-VARGAS & ZEPPELINI, 1995 estão listada como criticamente em perigo, elas possuem troglomorfismos evidentes, como a redução de olhos e alongamento de apêndices (ZEPPELINI *et al.* 2022; MMA, 2018; MMA, 2022).

1.4 Gênero *Trogolaphysa*

O gênero *Trogolaphysa* (Entomobryidae, Paronellinae) é amplamente distribuído no Brasil, podendo ser encontrado tanto no ambiente epígeo, na serapilheira, quanto hipógeo (ARLÉ & GUIMARÃES, 1979; CIPOLA & BELLINI, 2022; ZEPPELINI *et al.*, 2022; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024). MILLS (1938) descreveu este gênero baseado em caracteres potencialmente troglomórficos, como ausência de olhos e pigmentos, ao observar dois espécimes encontrados em cavernas do México (Figs. 1–2).

Atualmente, o gênero possui 83 espécies descritas no mundo, com formas troglomórficas e epígeas (Fig. 2) (ZEPPELINI *et al.*, 2022; BELLINGER *et al.*, 1996–2024; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024). Em geral, as espécies epígeas possuem antenas, cabeça e corpo pigmentados, 6–8 olhos e unguis com 3–4 dentes internos; seus apêndices são similares aos dos demais Entomobryoidea epiedáficos, sem alongamento evidente (Fig. 1; Fig. 2A–D). Por outro lado, espécies de *Trogolaphysa* que habitam estritamente cavernas ou meio superficial subterrâneo (MSS) geralmente possuem apêndices alongados, redução ou ausência de olhos, pigmentação e dentes no complexo empodial (Fig. 2E–F) (PALACIOS-VARGAS *et al.*, 1985; SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024; ZEPPELINI *et al.*, 2022).

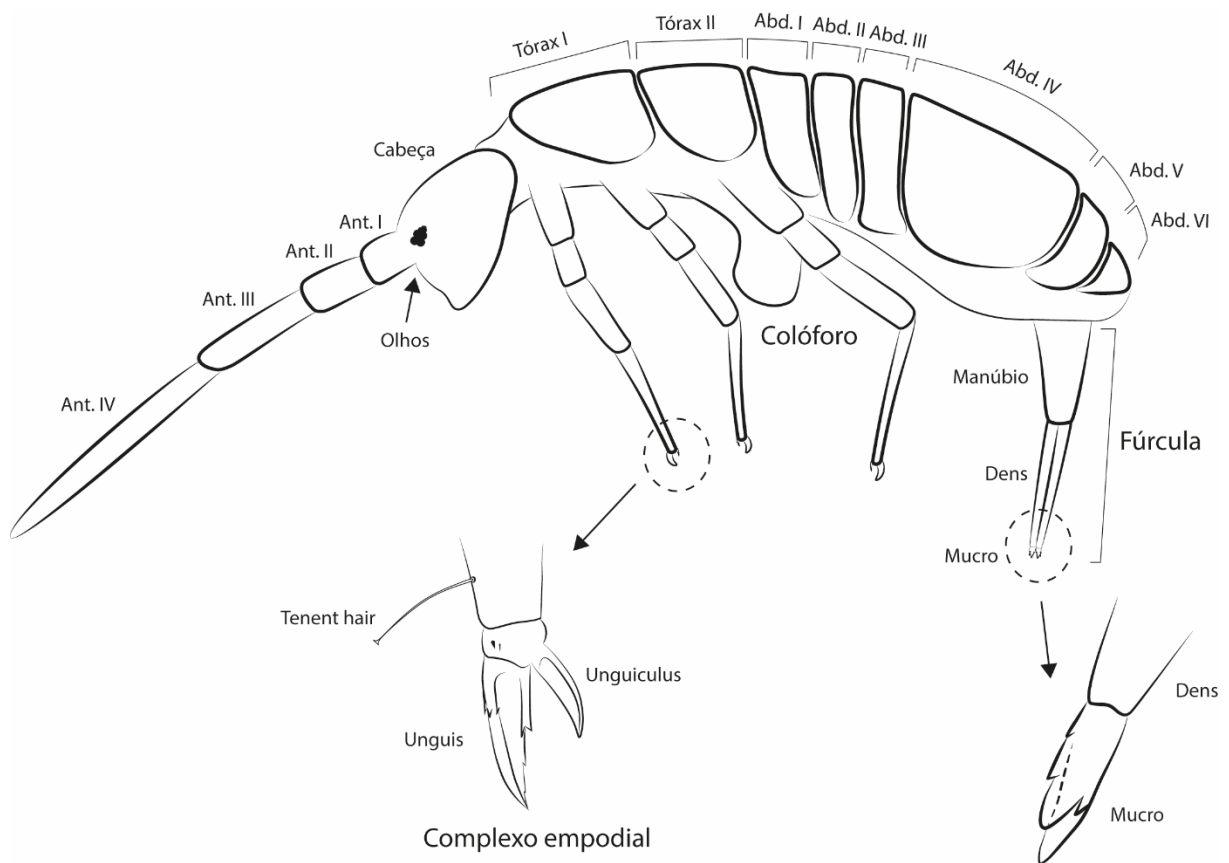


Figura 1. Morfologia geral de um espécime de *Trogolaphysa* (Paronellinae, Entomobryidae, Entomobryomorpha).

A maioria das espécies de *Trogolaphysa*, principalmente as mais antigas, foi descrita com base em poucos caracteres diagnósticos, como comprimento das antenas, padrão de coloração, forma do mucro e morfologia do complexo empodial (i.e. MILLS, 1938) (SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013; SOTO-ADAMES *et al.*, 2014; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024) (Fig. 1). O conhecimento sobre o gênero nas últimas décadas aumentou, e uma maior quantidade de espécies (30 spp.) foram descritas nos últimos 10 anos (NUNES & BELLINI

2018; NGUYEN & SOTO-ADAMES, 2018; CIPOLA & BELLINI, 2022; ZEPPELINI *et al.*, 2022; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024).

O estudo detalhado da quetotaxia (distribuição, forma e homologia das cerdas corporais) na taxonomia moderna de colêmbolos é essencial, pois caracteres tradicionais se tornaram insuficientes para separar espécies de *Trogolophysa* (SOTO-ADAMES *et al.* 2014; SOUZA, 2021; SOTO-ADAMES *et al.*, 2024). O uso exclusivo de caracteres morfológicos que descartam a quetotaxia obscurece as identidades reais de várias espécies consideradas amplamente distribuídas. Este é o caso de *T. hirtipes* (HANDSCHIN, 1924), descrita e registrada em cavernas do Brasil, mas também encontrada na Argentina; e as espécies *T. jataca* (WRAY, 1953) (Porto Rico e Jamaica), *T. luquillensis* (MARI-MUTT, 1987) (Porto Rico) e *T. geminata* (MARI-MUTT, 1987) (Porto Rico) que apresentam sobreposições de diversas características morfológicas (HANDSCHIN, 1924; MARI-MUTT, 1987; CASSAGNAU, 1963).



Figura 2. Comparação entre espécies de *Trogolophysa* edáficas (A–D); e cavernícolas (E–F). A–D, diferentes padrões de pigmentação e tamanhos de apêndices das espécies: A, *T. ernesti* Cipola & Bellini, 2017; B, *T. piracurucaensis* NUNES & BELLINI, 2018; C, *T. nigrolineata* CIPOLA & BELLINI, 2022; D, *T. judithnajtae* NGUYEN & SOTO-ADAMES, 2018. E, Habitus de espécie cavernícola de *Trogolophysa* sp. com redução de pigmentação. F, Espécie hipógea *Trogolophysa jacobyi* SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013 com redução de

pigmentação ocular e alongamento de antenas (figuras adaptadas de SOTO-ADAMES & TAYLOR, 2013; CIPOLA & BELLINI, 2017; SOTO-ADAMES & NGUYEN, 2018; NUNES & BELLINI, 2018; CIPOLA & BELLINI, 2022; ZEPPELINI *et al.*, 2022).

Há 75 espécies de *Trogolaphysa* descritas para a região Neotropical e o Brasil abriga cerca de 32% dessa riqueza (24 spp.), sendo o país mais representativo em número de espécies do gênero em todo o globo (ZEPPELINI *et al.*, 2024) (Fig. 2). É possível supor que espécies de *Trogolaphysa* que habitam cavernas se tornem possivelmente restritas a elas e, ao longo do tempo, devido à sua baixa motilidade, é esperado o isolamento de pelo menos parte desses indivíduos e perda de fluxo gênico entre as populações. Na Caatinga, esse processo é ainda mais esperado, sendo as cavernas deste bioma um refúgio natural, com temperaturas mais baixas e constantes e maior umidade em comparação ao meio externo (BENTO *et al.*, 2021).



Figura 3. Mapa da distribuição das espécies de *Trogolaphysa* no globo. Pontos vermelho no mapa representam a localização de espécies de *Trogolaphysa*.

A morfologia, naturalmente, é a principal forma de identificação de Collembola, e o conceito morfológico (tipológico) de espécie ainda é amplamente aplicado à taxonomia moderna do grupo. Entretanto, a utilização de uma única fonte de informação para a delimitação de espécies pode subestimar a real riqueza taxonômica de uma determinada linhagem (ZHANG *et al.*, 2018; MATEOS *et al.*, 2021). Outros métodos de delimitação de espécies podem ser utilizados como análises complementares ou principais para a descrição de novas espécies, seguindo diferentes pressupostos como: identidade morfológica, compatibilidade reprodutiva, conceito filogenético de espécie ou unificado (SOTO-ADAMES, 2002; CARSTENS *et al.*, 2013; FIŠER *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

1.5 Taxonomia integrativa em Collembola

Nos últimos anos, a integração de metodologias baseadas em evidências moleculares na taxonomia de Collembola tem auxiliado na descoberta, redescritção ou reposicionamento de táxons morfológicamente similares (ZHANG *et al.*, 2018; KATZ *et al.*, 2018; WINKLER *et al.*, 2020; BELLINI *et al.*, 2022). A utilização de *DNA barcoding* tem se mostrado eficaz na identificação da diversidade críptica dentro de táxons tratados como a mesma espécie, principalmente quando combinada a outros critérios taxonômicos como morfologia e distribuição (SOTO-ADAMES, 2002; ZHANG *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2018).

O gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COX1) tem sido amplamente utilizado na identificação de linhagens e cálculos de distância genética intra e interespecífica (HEBERT *et al.*, 2003; HOGG & HEBERT, 2004). Até o momento, a plataforma *Barcode of Life* (BOLD) possui cerca de 224.308 sequências públicas de Collembola depositadas e cerca de 10.061 *Barcode Index Number System* (BINs). Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), assim como BINs são resultado de algoritmos de agrupamento de táxons realizados a partir de sequências genética.

Análises moleculares utilizando o COX1 demonstram boa resolução na identificação de espécies em Collembola, com poucas exceções (KATZ *et al.*, 2015; ZHANG *et al.* 2018; YU *et al.*, 2018; MATEOS *et al.*, 2021). Estas análises moleculares auxiliam os taxonomistas de forma complementar aos caracteres morfológicos, e são capazes de separar e diagnosticar espécies crípticas, resultando em maior precisão na identificação taxonômica e maior compressão da biodiversidade e evolução de linhagens (ZHANG *et al.*, 2018; Kováč *et al.*, 2023).

1.6 Ameaças à fauna subterrânea

As cavernas desempenham um papel importante no estudo e compreensão dos processos biológicos devido à sua estabilidade ambiental (POULSON & WHITE, 1969), mas também possuem importante papel econômico na mineração brasileira (GOMES *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2010). A extração de calcário é uma atividade econômica presente nos municípios que possuem cavernas em rochas carbonáticas no RN (CRUZ *et al.*, 2010). Ao mesmo tempo, o estado possui produção de petróleo e gás natural “em terra” representativa para o país, sendo o sexto maior produtor destes recursos no Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2019).

Por outro lado, estas atividades econômicas estão associadas à perda ou degradação de habitats subterrâneos (FERREIRA & HORTA, 2001; BENTO *et al.* 2024). Até 2010, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) registrou no mínimo quatro incidentes ambientais relevantes em cavernas envolvendo a extração de minérios. Por exemplo, a extração de calcário afetou a caverna Capoeira de João Carlos e Caverna do Macaco, localizadas nos municípios de Governador Dix-sept Rosado e Apodi, respectivamente (CRUZ *et al.* 2010). Recentemente, BENTO *et al.* (2024) listaram ameaças identificadas nas cavernas da região oeste do RN, sendo elas: desflorestamento nas áreas de entorno, agricultura, mineração irregular, exploração de petróleo, pecuária, visitação desordenada e redução do nível das águas subterrâneas.

Segundo a Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº 43/2014, o processo de avaliação da conservação da fauna brasileira é responsabilidade do Programa Nacional de Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção – Pró-Espécies (MMA, 2014). Entretanto, toda avaliação é baseada nos dados científicos públicos existentes, sendo a compilação destes a primeira etapa para visualização do estado atual da conservação dos táxons. Dessa forma, a identificação e delimitação de espécies ou linhagens que habitam cavernas, aliadas ao conhecimento de sua distribuição e história evolutiva, podem auxiliar políticas de conservação com relação à indicação de cavidades ou zonas prioritárias para conservação, bem como dos recursos naturais presentes na Caatinga. É importante ressaltar também que elucidar questões taxonômicas é o início da busca por respostas às questões ecológicas e evolutivas.

Assim, este trabalho teve como objetivo explorar a diversidade críptica de *Trogolophysa* nas cavernas da região oeste do RN, através de um estudo morfológico e molecular, para esclarecer a aparente ambiguidade de caracteres taxonômicos entre espécies/populações proximamente relacionadas, bem como verificar se há congruência entre as abordagens morfológicas e moleculares que suportem a nomeação de linhagens como espécies diferentes. Além disso, visamos testar a posição filogenética de uma espécie de *Trogolophysa* da região amostrada dentre os Paronellinae e os Entomobryoidea, com base em seu mitogenoma. Por fim, descrevemos duas novas espécies de colêmbolos potencialmente troglóbios dos gêneros *Cyphoderus* e *Parrarhopalites* BONET & TELLEZ, 1947 de cavernas do RN.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a fauna de Collembola de cavernas do RN, investigando a diversidade críptica de *Trogolaphysa* por meio de um estudo integrativo morfológico e molecular, testando a posição filogenética de uma espécie do gênero proveniente da região, e descrevendo novos táxons encontrados.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar a diversidade genética do complexo de espécies de *Trogolaphysa* para delimitação de suas linhagens (Capítulo 1);
- Reconstruir o mitogenoma de *Trogolaphysa zeppelinii* (Soto-Adames & Bellini, 2015) comb. nov. e compreender seu posicionamento filogenético entre os Paronellinae (Capítulo 2);
- Descrever novas espécies de *Cyphoderus* e *Parrarhopalites* que habitam cavernas do RN (Capítulo 3).

Capítulo 1 - Diversidade críptica de *Trogolaphysa zeppelinii* (Soto-Adames & Bellini, 2015) comb. nov. (Entomobryidae, Collembola) em cavernas do seminário brasileiro

Resumo

A região oeste do Rio Grande do Norte abriga uma rica diversidade de invertebrados cavernícolas, incluindo populações de espécies troglóbias adaptadas a esses ambientes. Fatores climáticos favorecem a formação de refúgios subterrâneos que servem como abrigo para essas populações e, ao longo do tempo, podem estar associados à especiação e à distribuição desses organismos subterrâneos. Estudos recentes com colêmbolos têm utilizado abordagens integrativas, especialmente morfológicas e genéticas, para identificar novas linhagens, contribuindo para a sistemática, taxonomia e filogeografia do grupo. Inventários realizados em cavernas do estado revelaram uma ampla distribuição de morfoespécies morfológicamente semelhantes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo explorar a diversidade críptica de uma morfoespécie de *Trogolaphysa*, utilizando uma abordagem integrativa que combina métodos morfológicos e moleculares para delimitar suas linhagens, esclarecer ambiguidades taxonômicas e contribuir para o conhecimento da sistemática e evolução dessas espécies. Foram obtidas 32 sequências parciais do marcador mitocondrial (COX1) e 30 de rRNA, sendo 20 de 18S e 10 de 28S. A morfoespécie, inicialmente identificada como *Lepidonella zeppelinii*, foi transferida para *Trogolaphysa*, após revisão do material tipo. A delimitação das linhagens de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. resultou em cinco unidades taxonômicas operacionais bem definidas. Análises genéticas indicaram estruturação populacional com correlação positiva entre diversidade genética e distância geográfica. As árvores filogenéticas baseadas em 28S e 18S mostraram baixa resolução e politomias. Além disso, não foram encontrados caracteres morfológicos evidentes que sustentem a separação das linhagens. Assim, *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. deve ser considerada uma espécie única, com populações isoladas e bem estruturadas nas cavernas inventariadas. A aplicação de técnicas moleculares é fundamental para revelar essa diversidade oculta, assegurando seu reconhecimento e conservação. A identificação de espécies crípticas contribui para a compreensão da biodiversidade e é essencial para a formulação de estratégias eficazes de proteção, especialmente em áreas não protegidas, como a maioria das cavernas analisadas neste estudo.

Palavras-chave: filogeografia, taxonomia integrativa, conservação, caatinga.

1 INTRODUÇÃO

A região oeste do Rio Grande do Norte (RN) abriga 1.372 cavidades naturais, a maioria localizada em depósitos calcários da Formação Jandaíra, pertencentes ao Grupo Apodi (Angelim 2006; CECAV/ICMBio, 2022). Essas cavernas são habitat de uma diversidade de invertebrados terrestres, aquáticos e espécies troglóbias, como o hemíptero *Kinnapotiguara troglobia* Hoch & Ferreira, 2013 e o anfípode *Potiberaba porakuara* Fišer, Zgmajster & Ferreira, 2013, que apresentam adaptações morfológicas às condições particulares desses ambientes. Dentre os invertebrados terrestres, os Collembola são um dos táxons mais abundantes nas cavernas do oeste do RN, com algumas espécies possuindo ampla distribuição na região (Bento *et al.* 2021).

A hipótese de surgimento de relictos oceânicos ou climáticos é amplamente explorada para explicar a adaptação e evolução de linhagens cavernícolas, tanto para animais aquáticos quanto terrestres (Juan *et al.* 2010). A distribuição limitada de espécies troglófilas ou troglóbias entre as cavernas é um indicativo de dispersão restrita, oferecendo evidências importantes para estudos biogeográficos (Katz *et al.* 2018; Schuppenhauer *et al.* 2019). Modelos de especiação alopátrica sugerem que mudanças ambientais podem causar extinção ou retração de espécies com potencial troglófilo de superfície, restando apenas os indivíduos nas cavernas, que permaneceriam isolados e sujeitos à seleção natural, resultando em eventos de especiação (Juan & Emerson, 2010). Contudo, sistemas como drenagens paleoclimáticas e fendas subterrâneas que interconectam cavernas podem permitir a migração de populações, favorecendo o fluxo gênico entre elas (Juan & Emerson, 2010; Katz *et al.* 2018; Schuppenhauer *et al.* 2019).

As flutuações climáticas globais, como as secas do Mioceno, desempenharam um papel importante na estruturação populacional e diversidade genética de espécies de Collembola em cavernas (Guzik *et al.* 2020; Kováč *et al.* 2023). A Chapada do Apodi, no oeste do Rio Grande do Norte, foi impactada por eventos climáticos recentes, como as secas intensas do estágio Megalaiano, cerca de 4,2 mil anos atrás, o que modificou a paisagem física, causando aridificação e declínio da produção de solo, e a vegetação da região, com a dominância de espécies da Caatinga (Utida *et al.* 2020). Esses eventos, associados com o estabelecimento da forte sazonalidade vista na Caatinga, tornaram cavernas potenciais refúgios para populações de invertebrados, oferecendo proteção contra extremos ambientais (Bento *et al.* 2021).

O estudo de colêmbolos com morfologia conservada, como no caso das espécies de *Lepidocyrtus* Bourlet, 1839 e *Pseudosinella* Schäffer, 1897, tem se beneficiado de abordagens taxonômicas integrativas para identificação de novas linhagens (Katz *et al.* 2015, Winkler *et al.* 2020). Métodos que combinam dados morfológicos e genéticos têm sido fundamentais para delimitar espécies de forma mais precisa e entender melhor a diversidade local. Estudos que utilizam ferramentas moleculares, como DNA *barcoding*, muitas vezes revelam novas linhagens e possibilitam a descrição de novos táxons (Cicconardi *et al.* 2013; Mateos *et al.* 2018; Yu *et al.* 2018).

O gênero *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Entomobryidae, Paronellinae) é amplamente distribuído no Brasil em habitats epígeos e hipógeos (Arlé & Guimarães, 1979; Zeppelini *et al.* 2022; Zeppelini *et al.* 2025). Estudos anteriores em cavernas do RN demonstraram que este gênero está amplamente distribuído em ambientes subterrâneos da região (Bento *et al.* 2021). Compreender a diversidade de *Trogolaphysa* nestas cavernas é essencial, não apenas para a compreensão da biodiversidade local, mas também para a conservação dessas espécies, muitas das quais consideradas vulneráveis devido às ameaças antropogênicas que seus habitats enfrentam (ICMBio/MMA, 2018; Bento *et al.* 2024).

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo explorar a diversidade críptica de uma espécie de *Trogolaphysa* descrita baseada apenas em dados morfológicos, amplamente distribuída nas cavernas do oeste do Rio Grande do Norte, utilizando uma abordagem integrativa que combina métodos morfológicos e moleculares para delimitar suas linhagens, esclarecer ambiguidades taxonômicas e contribuir para o conhecimento da sistemática e evolução dessas espécies. Assim, as principais hipóteses deste estudo são: i) populações de *Trogolaphysa* da mesma caverna ou de cavernas próximas apresentam similaridade morfológica e molecular; ii) a distância entre cavernas é um fator limitante para as espécies de *Trogolaphysa*, pois seus espécimes apresentam baixa motilidade devido ao seu tamanho, favorecendo a estruturação populacional em diferentes cavidades amostradas no estudo.

2 METODOLOGIA

2.1 Origem do material biológico

O material biológico utilizado nas análises morfológicas e moleculares foi coletado em cavernas da Mesorregião Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil, nos municípios de Baraúna, Felipe Guerra e Governador Dix-sept Rosado entre 21–26 de julho de 2019 e 15–23 de agosto de 2022 (Fig. 1). As 10 cavernas inventariadas estão localizadas dentro do domínio da Caatinga, conhecido principalmente pela dominância de vegetação xerófila lenhosa-arbustiva

de baixo porte e clima quente e seco, com chuvas escassas e mal distribuídas durante o ano (Giulietti *et al.* 2004; Kottek *et al.* 2006). A localização das cavernas inventariadas está apresentada na Tabela 1 e Figura 1. Os mapas de distribuição foram construídos no software QGis v.3.30.2 (2024) utilizando dados extraídos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2024) e do CANIE/CECAV (2024).

Das cavernas amostradas, apenas Furna Feia, Furna Nova e Pedra Lisa estão legalmente protegidas dentro do Parque Nacional (PARNA) da Furna Feia, que possui 84,94 km² (8.494,00 ha) e 207 cavidades naturais, mais 45 na zona de amortecimento. O Parque abriga nascentes e cursos d'água, como o Córrego do Virgílio, além de rios subterrâneos, importantes para infiltração de água para o lençol freático, bem como para diminuir a temperatura localmente, já que as cavernas da região são capazes de armazenar água. Na região do PARNA Furna Feia há o registro de 176 espécies de aves, 31 espécies de mamíferos, além do registro de 16 espécies troglóbias (ICMBio, 2020).

Outras áreas inventariadas estão no município de Felipe Guerra, que abriga aproximadamente 462 cavidades (CANIE/CECAV, 2024). As cavernas Bota e Arapuá são próximas e estão localizadas no Lajedo Arapuá em Felipe Guerra. A caverna Boa, Carrapateira, Três Lagos e Urubu são relativamente próximas entre si também, mas estão inseridas em lajedos diferentes, sendo eles, respectivamente: Lajedo da Lapa, Lajedo Rosário, Lajedo do Brejo e Lajedo do Meio.

Por fim, a última caverna inventariada, Capoeira de João Carlos, está localizada no Lajedo da Ramadinha, no município de Governador dix-sept Rosado (Fig. 1, Tabela 1).

Tabela 1. Localização das cavernas inventariadas e lajedos em que estão inseridas no Rio Grande do Norte, Brasil.

Município	Nome da Cavidade Natural	Localização	Latitude (S)	Longitude (W)
Baraúna	Pedra Lisa	Parque Nacional da Furna Feia	05° 02' 44"	37° 31' 18.72"
	Furna Nova	Parque Nacional da Furna Feia	05° 02' 03.2"	37° 34' 16.2"
	Furna Feia	Parque Nacional da Furna Feia	05° 02' 12.8"	37° 33' 36.6"
Governador dix-sept Rosado	Capoeira de João Carlos	Fazenda Ramadinha	05° 30' 57"	37° 31' 41.4"
Felipe Guerra	Boa	Lajedo Lapa	05° 33' 59.5"	37° 41' 52.4"
	Urubu	Lajedo do Meio	05° 34' 23"	37° 39' 08.7"
	Três Lagos	Lajedo Brejo	05°35' 34.4"	37° 41' 12.7"
	Carrapateira	Lajedo Rosário	05° 33' 38.4"	37° 39' 50.2"
	Bota	Lajedo Arapuá	05° 31' 30.9"	37° 37' 05.3"

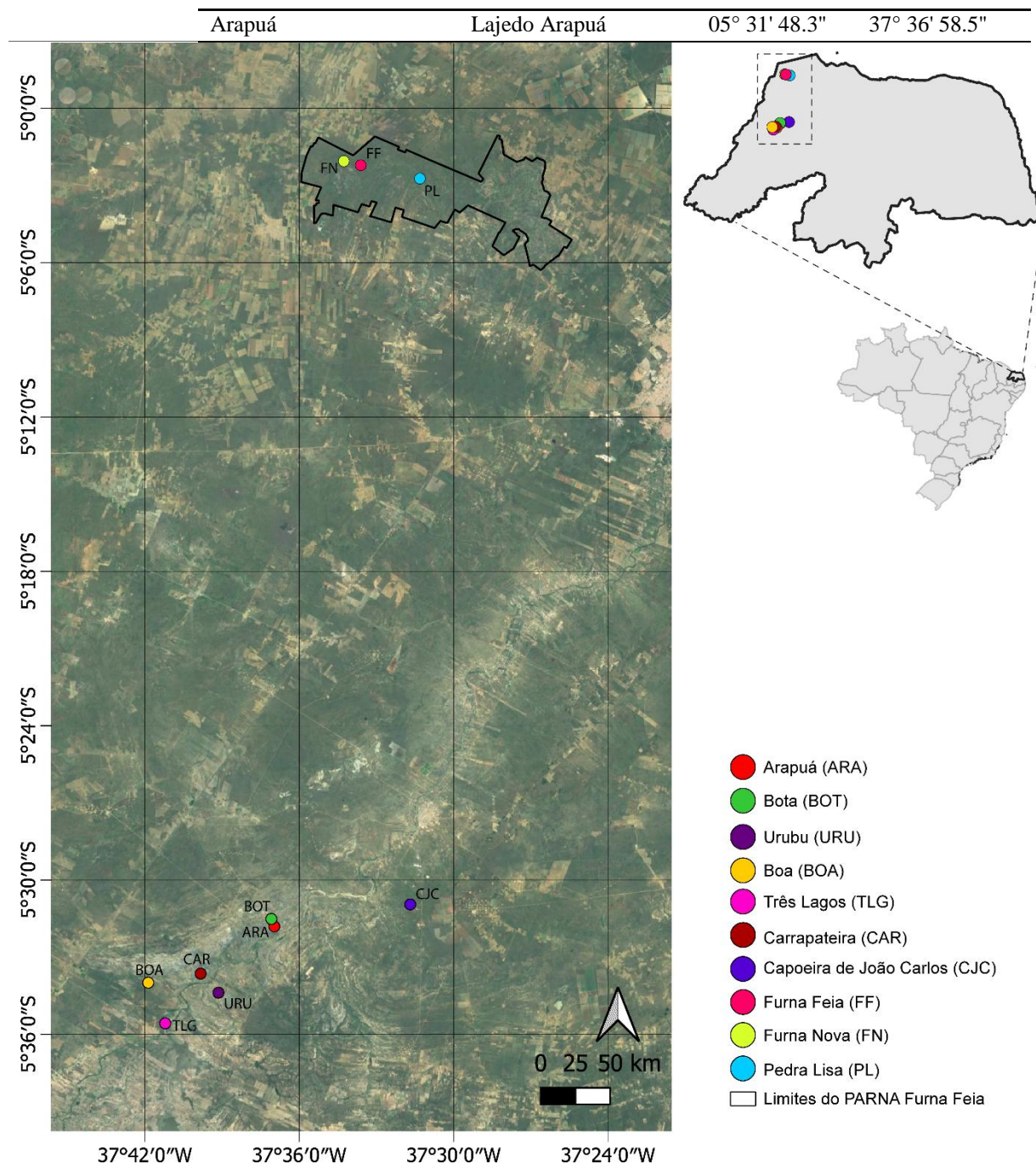


Figura 1. Mapa de distribuição das cavernas inventariadas na região oeste do Rio Grande do Norte.

A captura ativa dos espécimes foi realizada no interior das cavernas utilizando-se de pincéis embebidos em álcool absoluto e aspiradores entomológicos, em zonas com entrada de luz (zonas fótica e disfótica) e sem luz (afótica). A busca visual foi realizada em todos os potenciais microhabitats (locais úmidos e com acúmulo de matéria orgânica, tais como guano de morcegos e sob rochas). Os indivíduos capturados foram armazenados em criotubos com álcool absoluto (100%) e refrigerados imediatamente após a coleta em campo.

Em laboratório, indivíduos de cada caverna foram separados, diafanizados em líquido de Nesbitt e montados em lâminas semipermanentes em meio de Hoyer para confirmação taxonômica e estudo morfológico, seguindo protocolos de montagem para microscopia óptica disponíveis em Bellinger *et al.* (1996-2024) e Jordana *et al.* (1997). Posteriormente, as lâminas foram levadas à estufa de secagem por aproximadamente cinco dias a 50°C. As principais bibliografias utilizadas para identificação dos espécimes foram: Soto-Adames & Taylor (2013), Soto-Adames *et al.* (2014), Soto-Adames (2015), Soto-Adames & Bellini (2015), Bellini & Cipola (2017), Nunes & Bellini (2018), Cipola *et al.* (2022), Zeppelini *et al.* (2022) e Soto-Adames *et al.* (2024).

2.3 Identificação e descrição do material biológico

Os indivíduos foram comparados a espécies da literatura, as principais estruturas morfológicas estudadas e desenhadas foram: morfologia do bulbo apical e do ápice da antena IV; órgão apical da antena III, quetotaxia da cabeça (labro, lábio, dorso e ventre da cápsula cefálica); quetotaxia dorsal do tronco; morfologia do complexo empodial III; quetotaxia do fêmur, do colóforo e da fúrcula.

A nomenclatura utilizada nas ilustrações dos morfótipos foi baseada nas seguintes bibliografias: Gisin (1967) e Mari-Mutt (1986) para a quetotaxia labial; Fjellberg (1999) para estruturas do palpo labial; Cipola *et al.* (2014) para a quetotaxia labral; Mari-Mutt (1979), modificado por Soto-Adames (2008; 2015) para a quetotaxia dorsal da cabeça; Szeptycki (1979) para a quetotaxia dorsal, com adições de Soto-Adames *et al.* (2014) e Soto-Adames (2015).

2.4 Extração, amplificação (PCR) e sequenciamento do DNA

Antes de iniciar o procedimento de extração, os espécimes foram colocados em tubos criogênicos e deixados abertos por aproximadamente 15 minutos para secagem do álcool utilizado para preservação. Todas as extrações utilizaram somente um indivíduo para obtenção dos dados genéticos. Em colaboração com a *Université Paul-Valéry III*, associada ao *Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive* e *Centre National de la Recherche Scientifique* (CEFE-CNRS) da França, o DNA dos espécimes foi extraído com o kit “*DNeasy Blood & Tissue*” fornecido pela Qiagen; e na Universidade Federal da Paraíba, Brasil, com o kit “*Ludwig Blood and Tissue*” fornecido pela Ludwig Biotecnologia. Foi seguido o protocolo do manual da Qiagen, exceto pela etapa de eluição, em que foi utilizado 60 µl de água purificada.

O protocolo de extração do Kit Ludwig foi adaptado. Após a secagem do álcool, foram adicionados 180 µl de Buffer TL e 20 µl de proteinase K. Cada indivíduo utilizado foi

macerado e a solução foi misturada através de vórtex e incubada por 3h. Em seguida, foram adicionados 100 µl de isopropanol e cada amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 60 segundos. O líquido resultante foi transferido para coluna de extração, que foi centrifugada em 10.000 rpm por 90 segundos. O líquido depositado no tubo foi descartado, foram adicionados 500 µl de Buffer IR à coluna de extração e centrifugado por 45 segundos a 10.000 rpm para secagem da membrana. O líquido depositado foi novamente descartado e foram adicionados 600 µl de Buffer WB e centrifugado novamente por 45 segundos a 10.000 rpm. Foi repetida a etapa anterior em que foram adicionados mais 600 µl de Buffer WB e centrifugado por 45 segundos a 10.000 rpm. O líquido depositado foi novamente descartado e a coluna de extração foi novamente centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos. Por fim, foram adicionados 40 µl de Buffer EL e a coluna de extração foi transferida ao tubo final de armazenamento do DNA, e centrifugado por 90 segundos a 10.000 rpm.

Os fragmentos de DNA extraídos foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers LCO1490/HCO2198 para obtenção do fragmento mitocondrial do gene Citocromo Oxidase subunidade I; 18S1F/18S5R, 18S3F/18Sbi e 18S5F/18S9R, e do gene nuclear codificante da menor subunidade ribossômica (18S); e, por fim, AS1/OP4 e 28SrD1.2a/28Sbout para obter, respectivamente, os genes nucleares das regiões D1–3 e D7–10 da maior subunidade ribossômica (28S).

Para a amplificação por PCR, os seguintes reagentes foram utilizados: 10 µl de mistura para PCR (Master Mix) da Qiagen, 5 µl de água purificada e 4 µl de cada primer com concentração a 2 mM e 5 µl de DNA extraído, totalizando 25 µl por amostra. As configurações do termociclador para os ciclos de PCR foram: 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação; 30 segundos a 44 °C para anelamento dos primers; 1 minuto a 72 °C para alongamento do DNA, com finalização do alongamento por 10 minutos a 72 °C.

Após a PCR, as amostras foram verificadas em gel de agarose (2%) e aquelas que obtiveram sucesso (visualização de banda única) seguiram para sequenciamento. As amostras extraídas no Brasil foram sequenciadas pela ACTGene Análises Moleculares LTDA, sediada no Rio Grande do Sul, e aquelas extraídas no CEFE foram sequenciadas pela Eurofins Genomics sediada, na Alemanha.

Após testes com indivíduos de diferentes cavernas e PCR com diferentes temperaturas de anelamento (T_m), os *primers* AS1/OP4 e 18S1F/18S5R foram descartados, pois apresentaram bandas duplas ou não apresentaram bandas no gel de agarose (2%). Apenas os

produtos de PCR dos *primers* LCO1490/HCO2198, 18S5F/18S9R, 18S3F/18Sbi e 28SrD1.2a/28Sbout foram enviados para sequenciamento e utilizados nas etapas seguintes (Tabela 2).

A avaliação de qualidade dos cromatogramas foi realizada com o programa Geneious v.9.1.3 (Kearse *et al.* 2012) para verificar e corrigir eventuais erros de sequenciamento. Foram realizadas buscas por potenciais contaminantes e confirmação da identidade taxonômica/similaridade dos indivíduos com BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) no banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI). Sequências de COX1, 18S e 28S das espécies *Seira delamarei* Jacquemart, 1980 (MH579466, KC236255 e KC236292), *Cyphoderus similis* Folsom, 1927 (MT357800), *Cyphoderus javanus* Börner, 1906 (KM978401 e KM978338) e *Cyphoderopsis* sp. (KM978406, KM978408) disponíveis no GenBank foram incorporadas como grupos externos nas análises filogenéticas.

Tabela 2. *Primers* utilizados para amplificação do material genético dos indivíduos de *Trogolaphysa* das cavernas da região estudada.

Gene	Primers	Referência
Citocromo oxidase subunidade I (COX1)	HCO2198/LCO1490	Folmer <i>et al.</i> 1994
	18S1F/18S5R	Giribert <i>et al.</i> 1996
Subunidade ribossômica pequena (18S)	18S3F/18Sbi	Giribert <i>et al.</i> 1996
		Whiting <i>et al.</i> 1997
	18S5F/18S9R	Giribert <i>et al.</i> 1996
Subunidade ribossômica grande (28S)	AS1/OP4	Xiong <i>et al.</i> 2008
	28SrD1.2a/28Sbout	Whiting <i>et al.</i> 1997; Giribert <i>et al.</i> 2001

2.5 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando a ferramenta MAFFT 7.017 (Kato & Standley, 2013) implementada no Geneious v.9.1.3. O alinhamento das sequências foi corrigido manualmente, quando necessário e traduzido em aminoácidos para inspeção de erros, como a presença de códons de parada em sequência codificantes como o COX1. Sequências dúbias devido a sítios heterozigotos, com inserção de espaços (*gaps*) e abaixo de 600 pares de base (bp) para COX1 foram excluídas do conjunto de dados utilizados nas análises.

Para análise de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) foi utilizado o alinhamento de nucleotídeos, sem exclusão da terceira base do códon. O modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G sugerido pelo programa jModelTest 2.1.10 (Posada, 2008) foi utilizado para os marcadores COX1, 18S e 28S. A árvore consenso de ML foi realizada pelo RAxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014), implementado no Geneious, com valor de 1000 *bootstraps*. A reconstrução da árvore por BI foi realizada apenas com dados de COX1, e

foi utilizado o programa Mr. Bayes v.3.2.7a (Ronquist *et al.* 2012), com os seguintes parâmetros: 1.000.000 de gerações, amostradas a cada 1.000 e com *burnin* de 25%.

A árvore ultramétrica para análise do tempo de divergência foi reconstruída no programa BEAST v.1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007), com parâmetros definidos no BEAUTI v.1.10.4: modelo evolutivo GTR+G, relógio molecular relaxado, modelo coalescente com população constante e taxa de mutação mitocondrial para Hexapoda (0.0115) (Katz, 2020), cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) de 100 milhões de gerações e amostragens a cada 1000 gerações e *burnin* de 10% realizado no TreeAnnotator v.1.7. As árvores filogenéticas foram visualizadas no programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e posteriormente editadas no programa Adobe Illustrator 2020 v.24.1.1.

2.6 Distância genética e delimitação de espécies

A delimitação de espécies foi realizada por métodos baseados em distância genética e árvore ultramétrica, em que foram utilizados quatro modelos de delimitação, sendo quatro baseados em árvores (*General mixed Yule coalescent* - GMYC, *Poisson tree processes* - PTP, *Bayesian Poisson tree processes* - bPTP e *Multi-rate Poisson Tree Processes* - mPTP) e dois baseado em distância (*Automatic Barcode Gap Discovery* - ABGD e *Assemble Species by Automatic Partitioning* - ASAP). As análises ABGD, ASAP, bPTP, mPTP e GMYC foram realizadas em suas respectivas plataformas online: <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>, <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>, <https://species.h-its.org/>, <https://mptp.h-its.org/> e <https://species.h-its.org/gmyc/> (Puillandre *et al.* 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Zhang *et al.* 2013; Kapli *et al.* 2017; Puillandre *et al.* 2021). As análises ABGD e ASAP utilizaram Kimura 2 Parâmetros (K2P) como modelo de substituição. Por fim, a árvore ultramétrica necessária para análise GMYC foi obtida no software BEAST.

O cálculo das distâncias genéticas entre grupos e intragrupos de cavernas foi realizado no programa MEGA v.11.0.13 (Tamura *et al.* 2021). A análise de correlação entre as distâncias geográfica e genética foi conduzida no programa RStudio v.2024.04.01 utilizando o teste de Mantel com 1.000 permutações. Os pacotes *geosphere* (Hijmans, 2022), *parzer* (Chamberlain & Sagouis, 2021), *tidyverse* (Wickham *et al.* 2019), *vegan* (Oksanen *et al.* 2024) foram empregados na análise. Para a transformação dos dados espaciais de localização das cavernas foi utilizada a fórmula de Haversine (Sinnott, 1984), devido à limitada distância entre as localidades.

2.7 Análise de diversidade genética e haplotípica

A partir do conjunto de dados com 32 sequências parciais de COX1 de *Trogolaphysa*, foi realizada a distribuição de haplótipos no software DNAsp v.6 (Rozas *et al.* 2017) e a visualização da rede de haplótipos foi construída no PopArt v.1.7 utilizando TCS Network (<http://popart.otago.ac.nz>) (Clement *et al.* 2002).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), para testar as hipóteses de estruturação genética dos grupos-alvo de acordo com a distribuição das cavernas e rede de haplótipos. A AMOVA foi conduzida para investigar a estrutura genética de duas populações por sua distância geográfica, agrupando as populações da seguinte forma: o Grupo 1 incluiu as populações de ARA, BOT, URU, BOA, TLG, CAR e CJC, enquanto o Grupo 2 foi composto pelas populações de FF, FN e PL (Tab. 3).

Tabela 3. Informações sobre as cavidades inventariadas e identificação.

Nome da cavidade natural	Abreviações dos nomes das cavidades	Localização	Morfótipo
Pedra Lisa	PL	PARNA Furna Feia	1
Furna Nova	FN	PARNA Furna Feia	1
Furna Feia	FF	PARNA Furna Feia	1
Capoeira de João Carlos	CJC	Fazenda Ramadinha	1
Boa	BOA	Lajedo Lapa	1 2
Urubu	URU	Lajedo do Meio	2
Três Lagos	TLG	Lajedo Brejo	1 2
Carrapateira	CAR	Lajedo Rosário	1 2
Bota	BOT	Lajedo Arapuá	2
Arapuá	ARA	Lajedo Arapuá	2

2.8 Critério de validação de espécies

O critério para delimitação de espécies foi adaptado seguindo Zhang *et al.* (2018) e Yu *et al.* (2018). Assim, linhagens são consideradas distintas somente quando há: (I) congruência entre as delimitações morfológicas e moleculares (Padial *et al.* 2010); (II) diagnóstico morfológico confiável com nenhum ou poucos intermediários entre as linhagens; e (III) formação de agrupamentos genéticos com taxa de dissimilaridade maior ou igual a 5% entre as sequências de COX1 (Zhang *et al.* 2018). Linhagens incongruentes entre os critérios acima passaram pelos seguintes procedimentos: (I) busca de novos caracteres capazes de diferenciar as linhagens das demais; (II) rejeição dos resultados por sua incongruência com outras análises (Yu *et al.* 2018).

4 RESULTADOS

4.1 Análises moleculares das populações de *Trogolaphysa* amostradas

Do ponto de vista morfológico, os representantes das diferentes populações de *Trogolaphysa* foram identificados como *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (mais detalhes sobre isso são apresentados no próximo tópico). Os indivíduos das cavernas Pedra Lisa (PL), Furna Nova (FN), Furna Feia (FF), Boa (BOA) e Três Lagos (TLG) foram identificados como *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. 1 (morfótipo 1), enquanto os indivíduos das cavernas Carrapateira (CAR), Capoeira de João Carlos (CJC), Urubu (URU), Arapuá (ARA) e Bota (BOT) foram assinalados como *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. 2 (morfótipo 2) (Fig. 5; Tab. 3). Os dois morfótipos apresentam alta similaridade morfológica, diferindo especialmente na quantidade de macroquetas internas no Abd. IV e pseudoporos da placa manubrial (Tab. 4).

Foram obtidas 32 sequências parciais de COX1, 20 de 18S e 10 de 28S de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. As sequências do DNA ribossômico 18S e 28S apresentaram sítios heterozigotos, dificultando a interpretação dos dados genéticos e correção manual desses marcadores. Portanto, a maioria das sequências de 18S e 28S foi descartada, o que reduziu o conjunto de dados nucleares e, por isso, estes marcadores foram utilizados apenas para inferência filogenética de ML (Tab. 4; Fig. 3). A partir do conjunto de dados de COX1 foram geradas árvores de ML, BI, rede de haplótipos, matriz de distância genética e análise de dinâmica populacional (Fig. 2).

A reconstrução filogenética de ML e BI para o marcador COX1 resultou em árvores consenso com a mesma topologia e com dois clados bem definidos e com elevados valores de suporte (*bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente) (Fig. 2). Os indivíduos das cavernas Pedra Lisa, Furna Nova e Furna Feia foram agrupados em um clado com alto suporte para as duas análises, assim como os indivíduos das cavernas Três Lagos, Boa, Carrapateira, Capoeira de João Carlos, Urubu, Arapuá e Bota (Fig. 2). Já as árvores de ML para o conjunto de dados nucleares não resultaram em clados bem definidos (Fig. 3).

A delimitação das linhagens pelos métodos ASAP, PTP, bPTP, mPTP e GMYC resultou em cinco unidades taxonômicas operacionais (OTUs) bem definidas. A OTU-1 foi composta por indivíduos das cavernas FN e FF; a OTU-2 apenas por PL; a OTU-3 por indivíduos de BOA, CAR e TLG; a OTU-4 por indivíduos de CJC; e a OTU-5 por URU, BOT e ARA. Apenas a delimitação por ABGD resultou em três linhagens, sendo a primeira composta pela OTU-1, a segunda pela OTU-2 e a terceira pela OTU-3 + OTU-4 (Fig. 2).

A distância genética intrapopulacional foi baixa, e variou entre 0–0,0076 (0%–0.76%). Já a distância entre as populações de cada caverna variou entre 0,0024–0,1829 (0%–20%) (Tab. 5). O teste de Mantel demonstrou que a distância genética entre as populações está positivamente correlacionada com a distância entre as cavernas ($r = 0.93$; $p = 0.0009$), corroborando também a estruturação populacional apresentada na rede de haplótipos (Fig. 4). Apenas as cavernas BOA + TLG e ARA + BOT apresentaram haplótipos compartilhados.

Tabela 4. Detalhes sobre a identificação morfológica e tamanho dos marcadores moleculares das diferentes populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. amostradas no estudo.

Caverna	Morfótipo	Abd. IV internal mac	Manúbrio psp	Sequências COX1	Sequências 18S	Sequências 28S
PL	1	(4)3-5	3-4	4 (622 bp)	2 (1390 bp)	2 (872–1001 bp)
FN	1	(4)3-5	3-4	3 (622 bp)	2 (1364–1394 bp)	1 (627 bp)
FF	1	(4)3-5	3-4	3 (594–622 bp)	3 (1386–1404 bp)	-
BOA	1 2	3-5	1-2	4 (622 bp)	2 (1158–1393 bp)	-
TLG	1 2	3-5	1-2	2 (622 bp)	2 (1164–1393 bp)	-
CAR	1 2	3	2-3	3 (622 bp)	2 (1176–1393 bp)	2 (879–1114 bp)
CJC	2	3	2	2 (622 bp)	2 (1366–1392 bp)	2 (1113–1115 bp)
URU	2	3	1-3	3 (622 bp)	1 (1388 bp)	1 (1115 bp)
BOT	2	3	2	3 (622 bp)	2 (1399 bp)	1 (1022 bp)
ARA	2	3	2	5 (622 bp)	2 (1389–1393 bp)	1 (1054 bp)
Total				32	20	10

Tabela 5. Distância genética média intrapopulacional (diagonal principal) e interpopulacional de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. baseado no marcador COX1.

	ARA	BOT	URU	BOA	TLG	CAR	CJC	FF	FN	PL
ARA	0,0026									
BOT	0,0024	0,0021								
URU	0,0105	0,0103	0,0022							
BOA	0,0631	0,0644	0,0542	0,0076						
TLG	0,0645	0,0657	0,0555	0,0065	0,0000					
CAR	0,0663	0,0675	0,0573	0,0119	0,0103	0,0032				
CJC	0,0782	0,0783	0,0679	0,0737	0,0750	0,0768	0,0032			
FF	0,1777	0,1790	0,1782	0,1749	0,1737	0,1748	0,2011	0,0011		
FN	0,1792	0,1804	0,1796	0,1724	0,1709	0,1734	0,1981	0,0076	0,0065	
PL	0,1808	0,1829	0,1863	0,1552	0,1506	0,1525	0,1786	0,1034	0,1036	0,0025

*Modelo de substituição: Kimura 2 Parâmetros. Legendas para os nomes das cavernas apresentada na Tabela 2.

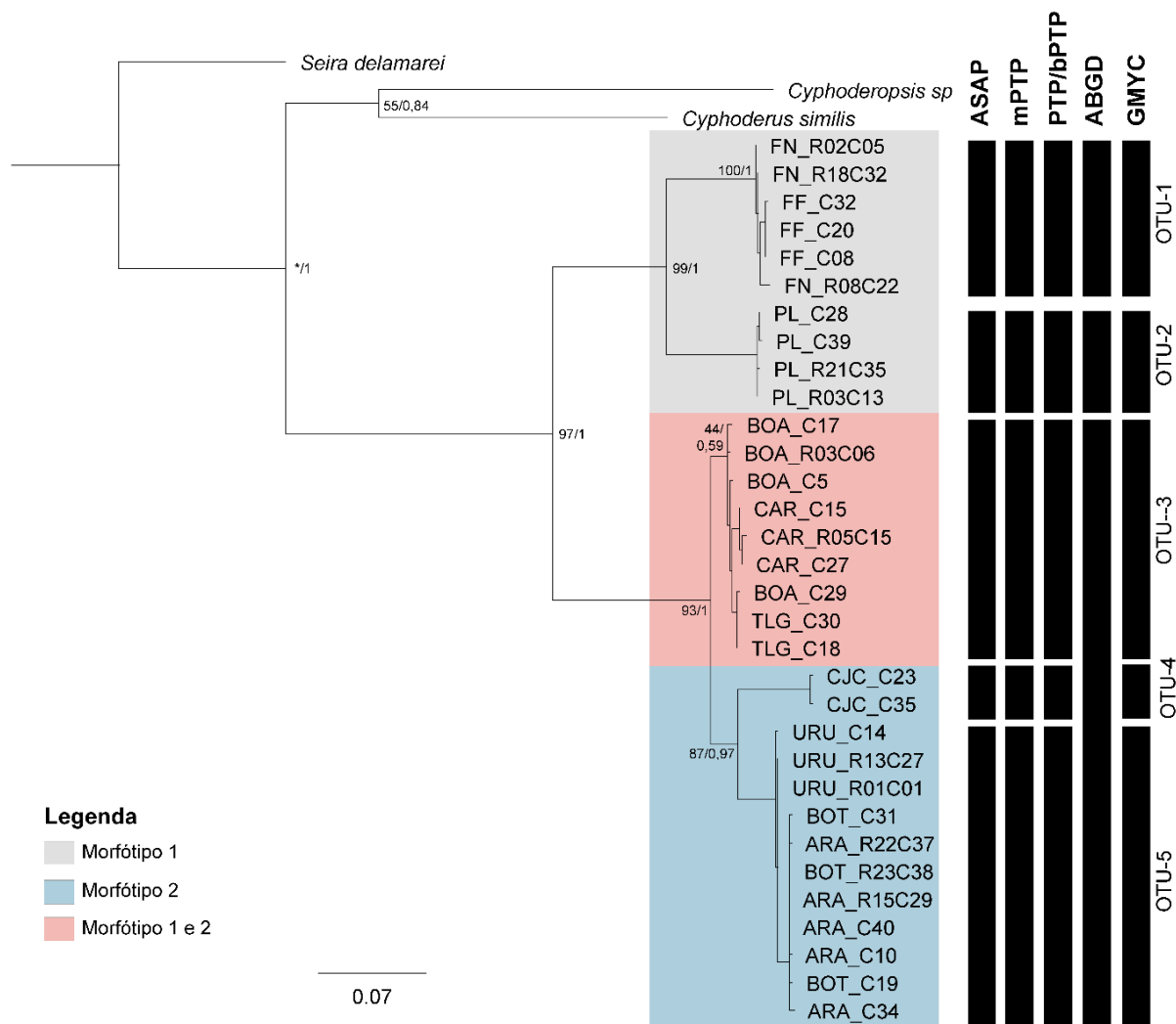


Figura 2. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança utilizando 32 sequências de COX1 de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. e três espécies próximas de Entomobryidae como grupo externo. (A) Barras verticais representam as delimitações das OTUs pelos métodos ASAP, mPTP, PTP/bPTP, ABGD e GMYC. Nós da filogenia com valores de *bootstrap* (ML) e probabilidade posterior (BI), respectivamente; *valor de *bootstrap* não apresentado. Abreviações para os nomes das cavernas apresentada na Tabela 2.

As árvores filogenéticas e a estruturação populacional com COX1 indicam cinco linhagens de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. bem suportadas, mas apenas duas linhagens com monofilia recíproca, sendo a primeira composta por OTU-1 + OTU-2 e a segunda por OTU-3 + OTU-4 + OTU-5. Os indivíduos das cavernas FF, FN e PL (OTU-1 + OTU-2) estão mais proximamente relacionados que os indivíduos das outras cavernas. Isto pode ser visualmente observado na distância genética entre as cavernas (Tab. 5) e na quantidade de mutações entre os haplótipos (Fig. 4).

Os resultados da AMOVA revelaram que a maior parte da variação genética foi encontrada entre os grupos, correspondendo a 64,49% da variação total (variância de 30,84). Isso indica uma diferenciação genética entre as divisões populacionais nas cavernas ao Norte

(Grupo 1) e ao Sul (Grupo 2). O índice de fixação, FST (0,96), indica uma alta diferenciação genética total entre as populações, o que sugere um fluxo gênico extremamente limitado ou quase inexistente entre elas. O índice FSC (0,88) aponta para uma forte estruturação genética dentro de cada grupo. E, por fim, o índice FCT (0,64) reforça que há uma alta diferenciação genética entre os dois grupos estabelecidos. Os testes de significância indicaram que todos os componentes de variância e índices de fixação são altamente significativos ($P < 0.01$), reforçando a robustez da estruturação populacional e genética observada.

Embora as análises genéticas tenham resultado na divisão de linhagens, com rede de haplótipos, teste de Mantel e AMOVA apresentando correlação positiva entre a diversidade genética e a distância para estruturação populacional, as árvores filogenéticas baseadas em dados nucleares (28S e 18S) resultaram em politomia e baixa capacidade de resolução das relações entre as populações (Fig. 3). Além disso, não há caracteres morfológicos evidentes que sustentem a separação de cinco linhagens, segundo métodos de delimitação, ou duas linhagens, segundo as análises filogenéticas. Dessa forma, a espécie *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. distribuída nas cavernas do RN possui populações bem estruturadas e isoladas do ponto de vista do fluxo gênico e, portanto, devem ser consideradas linhagens isoladas, apesar da baixa diferenciação morfológica.

Tabela 6. Teste de análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar quanto da variação genética observada nas sequências do COX1 de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. pode ser explicada de acordo com a localização das cavernas ao Norte e ao Sul da área inventariada.

Fonte de variação	Graus de Liberdade (d.f.)	Somas quadráticas (SS)	Média da variação	% de variação	FSC	FST	FCT
Entre grupos	1	477.402	30.84	64.49	0.88*		
Entre as populações dentro dos grupos	8	393.773	15.04	31.45		0.96*	
Dentro dos grupos	22	42.700	1.94	4.06			0.64*
Total	31	913.875	47.82				

* valor de $p < 0.01$

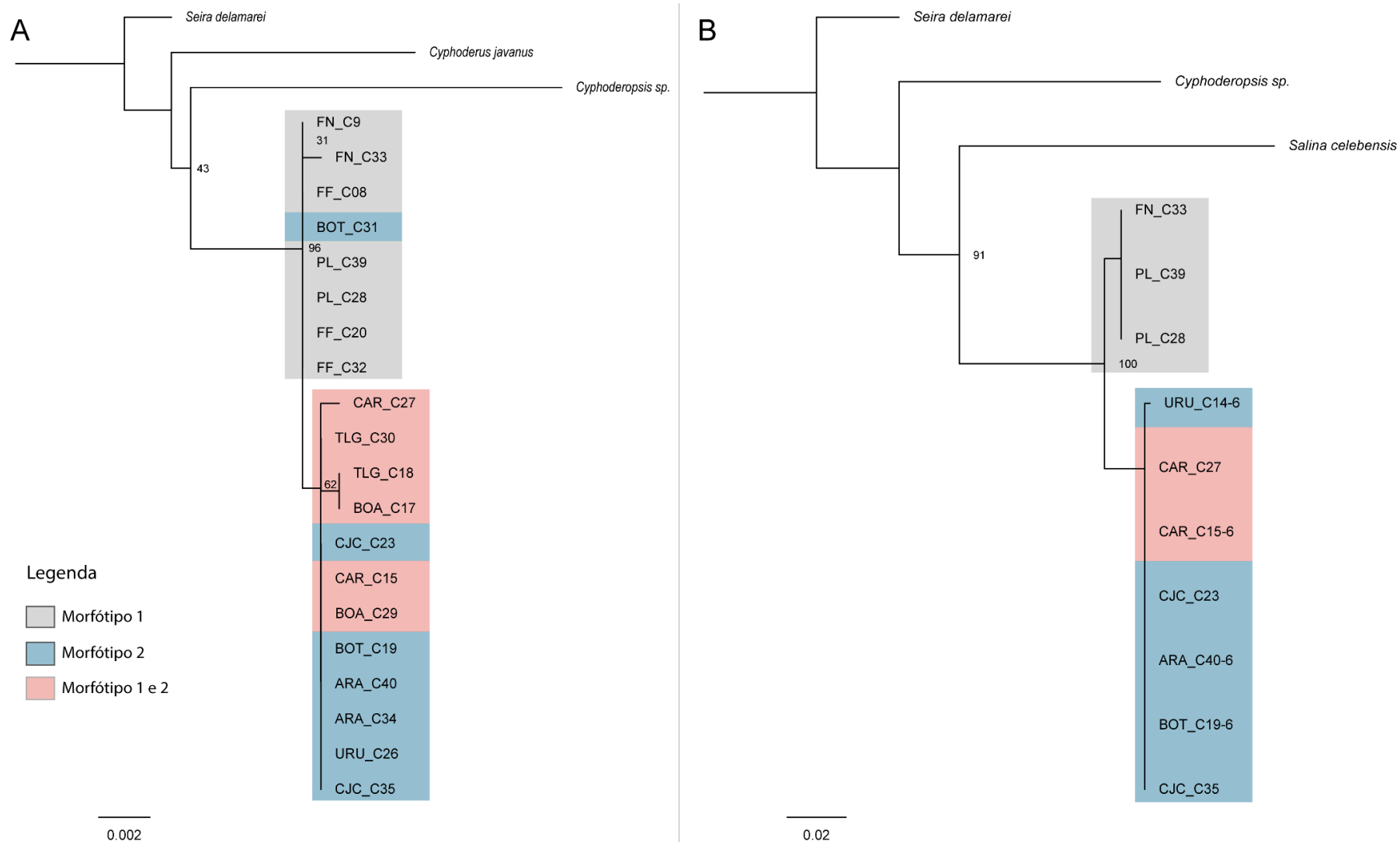


Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em marcadores nucleares de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. e três espécies próximas de Entomobryidae como grupo externo. (A) Árvore filogenética com 20 sequências de 18s. (B) Árvore filogenética com 10 sequências de 28s. Nós das filogenias com valores de *bootstrap*. Legendas para os nomes das cavernas apresentada na Tabela 2.

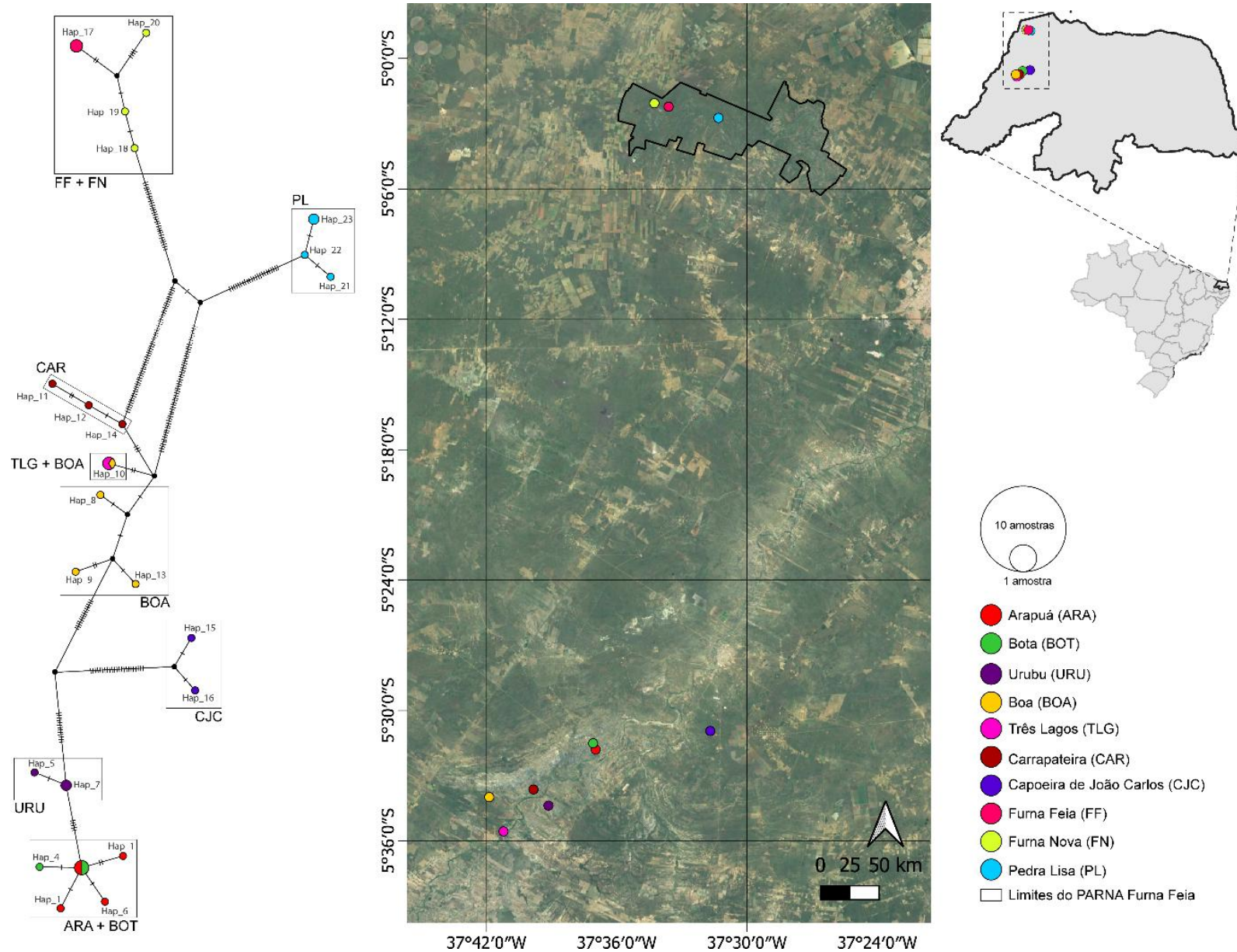


Figura 4. Rede de haplótipos e distribuição das localidades das populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. baseado no marcador mitocondrial COX1.

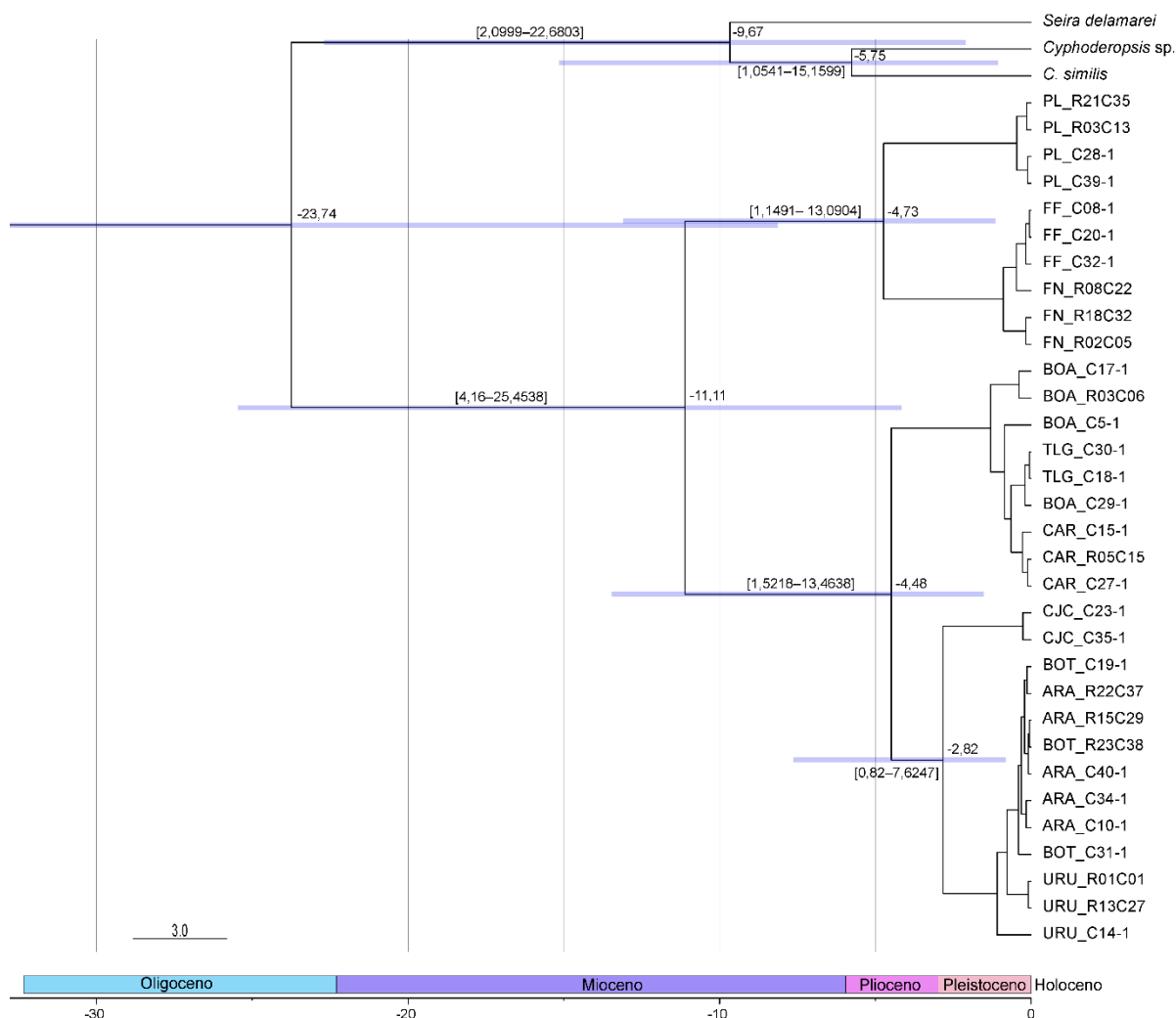


Figura 5. Árvore consenso ultramétrica das linhagens de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. com idade média estimada baseada na taxa de mutação mitocondrial para Hexapoda. Nós com valores de 95% HPD e variação da idade média para separação das linhagens.

4.2 Redescrição de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov.

A espécie *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. foi descrita originalmente no gênero *Lepidonella* Yosii, 1960, em remanescentes de Floresta Atlântica do Rio Grande do Norte (Soto-Adames & Bellini, 2015). Entretanto, após revisão do material tipo depositado na Coleção de Collembola da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, foi possível identificar que *L. zeppelinii* pertence ao gênero *Trogolaphysa*, devido à quantidade de tricobótrias presentes no Abd. IV (Deharveng *et al.* 2018), além de corresponder, do ponto de vista morfológico, aos morfótipos obtidos nas cavernas do oeste potiguar. Dessa forma, os desenhos dos morfótipos de *T. zeppelinii* comb. nov. neste trabalho complementam a descrição da espécie, sendo necessária análises moleculares para delimitar o limite genético

entre a população de *T. zeppelinii* comb. nov. dos remanescentes de Mata Atlântica e da Caatinga. A redescrição da espécie está apresentada abaixo, destacando as variações observadas nos dois morfótipos deste estudo.

Ordem Entomobryomorpha Börner, 1913

Superfamília Entomobryoidea Womersley, 1934

Família Entomobryidae Börner, 1906 *sensu* Godeiro *et al.* 2022

Subfamília Paronellinae Börner, 1906 *sensu* Godeiro *et al.* 2022

Gênero *Trogolaphysa* Mills, 1938

Diagnose: Pigmentação pálida ou ausente (em espécies hipógeas); formas epígeas geralmente pigmentadas. Escamas hialinas distribuídas na Ant. I–II, cabeça (dorsal e ventral), troco dorsal, face ventral do manúbrio e dens. Ant. IV sem subsegmentos, levemente anelada ou lisa; bulbo apical ausente. Labro sem papilas externas; papilas internas, se presente, em forma de espinhos, raramente em forma de “franjas”. Cerdas pré-labiais lisas ou ciliadas. Olhos presentes ou ausentes. Cabeça dorsal com tricobótria anterior lateral à Ant. I, microqueta **Ps3** ausente. Cerdas labiais L1 e L2 subiguais, L2 nunca reduzida. Região pós-labial geralmente com muitas cerdas organizadas em uma ou duas linhas transversais. Quetotaxia do Th. II–III e Abd. I reduzidas em espécimes adultos. Tronco dorsal (Th. II–Abd. V) com **ms** e sensilas, sendo respectivamente: 10|10100 e 11|011+2–3. Abd. IV com 3 tricobótrias. Manúbrio sem espinhos. Dens com uma ou duas fileiras de espinhos ciliados. Mucro quadrado (curto), subretangular (intermediário) ou rectangular (longo), com 3–5 dentes (Mills 1938; Soto-Adames *et al.* 2014; Soto-Adames 2015; Bellini & Cipola 2017; Nguyen & Soto-Adames 2018; Souza 2021; Zeppelinii *et al.* 2022; Soto *et al.* 2024)

Espécie-tipo: *Trogolaphysa maya* Mills, 1938.

Trogolaphysa zeppelinii (Soto-Adames & Bellini, 2015) comb. nov.

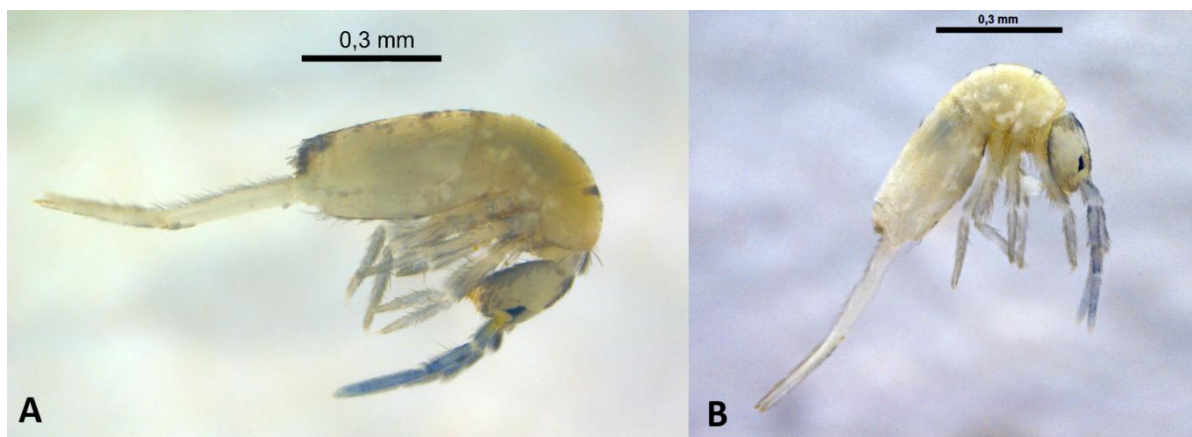


Figura 6. Habitus de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. em álcool. (A) espécime da caverna Furna Feia; (B) espécime da caverna Urubu.

Material tipo. Holótipo fêmea em lâmina; Brasil, Rio Grande do Norte, Macaíba, 12/X/2011, coll. B. C. Bellini. Depositado na Coleção de Collembola do DBEZ/UFRN. Parátipos da mesma que o holótipo: 1 macho e 2 fêmeas em lâminas depositadas na Coleção de Collembola do DBEZ/UFRN; 1 macho e 1 fêmea em lâminas depositadas na Coleção Entomológica do Museu Nacional do Rio de Janeiro (CM/MNRJ).

Outros materiais examinados depositados na Coleção de Collembola do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte:

- Brasil, Rio Grande do Norte, Baraúna, Parque Nacional da Furna Feia, caverna **Furna Feia** (05°02'13.38"S; 37°33' 35.24"W), 22/VII/2019; Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Parátipos: 8 fêmeas.
- Brasil, RN, Baraúna, caverna **Furna Nova** (05°02'03.8"S; 37°34'15.8"W), 21/VII/2019, Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 1 macho, 2 fêmeas e 1 juvenil.
- Brasil, RN, Baraúna, caverna **Pedra Lisa** (05°02'44.0"S; 37°31'18.72"W), 21/VII/2019, Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 3 fêmeas, 1 machos e 2 juvenis.
- Brasil, Rio Grande do Norte, Felipe Guerra, caverna **Urubu** (05°34'21.7"S; 37°39'08"W), 24/VII/2019. Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 10 fêmeas e 2 machos.
- Brasil, RN, Felipe Guerra, caverna **Bota** (05°31'30.9"S; 37°37'05.3"W), 26/VII/2019, Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâmina: 6 fêmeas e 1 macho.
- Brasil, RN, Felipe Guerra, caverna **Arapuá** (05°31'48.2"S; 37°36'58.5"W), 23/VII/2019. Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 3 fêmeas, 1 macho e 4 juvenis.
- Brasil, RN, Gov. dix-sept Rosado, caverna **Capoeira de João Carlos** (05°30'57.0"S; 37°31'42.0"W), 23/VII/2019. Souza P.G.C, Bento D. M., Iatagani, Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 2 machos, 5 fêmeas e 1 juvenil.
- Brasil, RN, Felipe Guerra, caverna **Boa** (05°33'59.5"S; 37°41'52.4"W), 23/VII/2019. Souza P.G.C., Bento D. M., Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 3 fêmeas, 1 macho e 2 juvenis.
- Brasil, RN, Felipe Guerra, caverna **Três Lagos** (05°35'34.4"S; 37°41'12.7"W), 25/VII/2019. Souza P.G.C., Bento D. M., Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 4 fêmeas e 3 juvenis.
- Brasil, RN, Felipe Guerra, caverna **Carrapateira** (05°33'38.4"S; 37°39'50.2"W), 25/VII/2019. Souza P.G.C., Bento D. M., Bellini B.C., Silva G.M. coll. Indivíduos em lâminas: 2 fêmeas e 1 juvenil.

Diagnose. Corpo com cerca de 2 mm. Espécimes com pigmentação distal na Ant. I, Ant. II–IV pigmentadas; pernas com pigmentação difusa; mancha ocular preta. Antenas duas vezes maiores que o comprimento da cabeça. Antena IV lisa, com um órgão sensorial apical. Sensilas do órgão apical da Ant. III normais. 8+8 olhos. Cerdas pré-labrais ciliadas, 2 espinhos labrais presentes, normais e separados. Fórmula labial: **M1–2rEL1–2a1–5**, **r** reduzida. Quetotaxia dorsal cefálica com 11–16 **An** mac, **A0**, **A2**, **S5**, **Pa5** e **Pm3** como mac; 4–5 mic interoculares; cerdas pós-labiais basais 5–10. Mesotórax maior que o comprimento mediano do metatórax. Th. II com **a5** e 3 mac no complexo **p3**. Th. III sem mac. Abd. I com mic **a6**. Abd. II com 2 (**m3** e **m5**) e Abd. III com 3 (**m3**, **am6**, **pm6**) mac, respectivamente; Abd. IV com 3–4 mac internas (**A3**, **A5**, **B4** e **B5**; **B4** mic ou ausente), **B6** como mês; 9–13 cerdas posteriores e 4–9 psp. Órgão metatrochanteral com 21–35 cerdas em forma de espinhos. Úngues com 3–4 dentes internos, 2 basais simétricos, 1 medial e 1 apical (presente ou ausente); unguículos lanceolados com lamela postero-externa serrilhada; *tenent-hairs* capitados. Colóforo anterior com 2+2 ou 3+3 mac distais; *lateral flap* com 3–7 ciliadas e 5–6 lisas. Placa manubrial com 4–5 cerdas e 2–3 psp. Dentes com 2 fileiras de espinhos ciliados com 21–44 espinhos interno e 19–51 espinhos externo. Mucro curto ou longo (proporção largura: comprimento do mucro = 1: 2.1–4.5), com 4 dentes.

Descrição. Comprimento total (cabeça + tronco) dos espécimes das cavernas variando entre 1,5–2,6 mm (holótipo = com 1,8 mm). Habitus típico de Paronellini. Espécimes pálidos com pigmentação azul clara distal na Ant. I; Ant. II–IV pigmentadas; pernas com pigmentação dispersa; cabeça e corpo sem pigmentação evidente (Fig. 6). Escamas fortemente ciliadas, apicalmente arredondadas, cobrindo Ant. I–II, Ant. III (região proximal), cabeça dorsal e ventral, tronco dorsalmente, manúbrio e dentes ventralmente. Pernas e colóforo sem escamas.

Cabeça (Fig. 7). Antenas até 2.2 vezes maiores que a diagonal cefálica (1.7–2.2 mm), Ant. I: II: III: IV = 1: 1,5: 1,1: 2,1. Ant. IV lisa, com um órgão sensorial apical, sem bulbo apical (Fig. 7A–B). Órgão sensorial da Ant. III com dois bastões sensoriais normais e três sensilas-guarda circundantes, uma ventro-lateral reduzida (Fig. 7C–D). Ant. II dorsalmente com três tipos de sensilas: acuminadas, arredondadas e inchadas no ápice (Fig. 7E–F). Quatro cerdas pré-labrais ciliadas. Fórmula das cerdas labrais: 4 (**a1–2**), 5 (**m0–2**) e 5 (**p0–2**), todas lisas, cerdas **p** mais longas que as outras, cerdas **a** mais espessas que as outras (Fig. 7G–H); dois espinhos ventrais labrais lisos, em papilas individualizadas (Fig. 7I–J). Fórmula das papilas dos palpos labiais (e cerdas-guarda) como **H**(2), **A**(0), **B**(5), **C**(0), **D**(4), **E**(4) + **l.p.**;

l.p. não atingindo o ápice da papila **E** (morfótipo 1) ou atingindo o ápice da papila **E** (morfótipo 2) (Fig. 7K–L). Lobo maxilar externo com cerdas basais e distais subiguais e lisas; placa sublobal com 2 apêndices lisos (Fig. 7M–N). Campos labiais basolateral e basomedial com cerdas **M1–2**, **E**, **L1–2** ciliadas, **r**, **a1–5** lisas, **r** reduzida (Fig. 7O–P). Quetotaxia ventral pós-labial com cerdas ciliadas anteriores **G1–4**, **H1–4** e **J1–2**; sulco cefálico com 3+3 cerdas anteriores, 1+1 mediais e 6–10 cerdas posteriores basais (morfótipo 1) ou 5–7 (morfótipo 2) (Fig. 7Q–R). Olhos 8+8, lentes A–F subiguais, G e H menores; 4 mic interoculares (morfótipo 1) ou 5 mic intraoculares (morfótipo 2) (Fig. 8A–B). Quetotaxia dorsal com 15–16 cerdas antenais (**An**) (morfótipo 1) ou 11–14 cerdas antenais (morfótipo 2), 4–5 anteriores (**A0**, **A1–3** e **A5**, **A1** presente ou ausente), 4 mediais (**M1–4**), 4 suturais (**S2–5**), 2 pós-occipitais (**Ps2** e **Ps5**), 4 postero-anteriores (**Pa2–3**, **Pa5**, **Pa6** como tricobótria pós-ocular), 2 postero-mediais (**Pm1** e **Pm3**), 6 postero-posteriores (**Pp1–4**, **Pp6–7**) e 2 cerdas postero-externas (**Pe4** e **Pe6**) (Fig. 7A–B).

Quetotaxia do tronco (Fig. 8–9). Fórmula das mac centrais do Th. II ao Abd. IV como: 3, 0/0, 2, 4, 3. Th II com 1 S-microcerda (**ms**), 1 sens anterolateral (**al**), 1 cerda anterior (**a5** mac), 2 mediais (**m2** e **m4**; **m2** presente ou ausente no morfótipo 1) e 6 cerdas posteriores (complexo **p3** com 3 mac e **p5–6e** como mic) (Fig. 8B; 8H). Th. III com 1 sens **al**, 2 cerdas anteriores (**a2** e **a4** como mic; **a2** presente ou ausente no morfótipo 1), 1 medial (**m6** como mic) e 3 cerdas posteriores (**p2–3** e **p6** como mic) (Fig. 8C; 8I). Abd. I com 1 **ms**, 1 cerda anterior (**a6**), 4 mediais (**m2–4** e **m6**) e 1 cerda posterior (**p6**) (Fig. 8D; 8J). Abd. II com 1 sens anterosubmedial (**as**), 4 cerdas anteriores (**a2–3** como escamas acessórias, **a5** como tricobótria e **a7** como mic), 3 mediais (**m2** como tricobótria, **m3** e **m5** como mac) e 3 cerdas posteriores (**p5–7** como mic); cerda **el** presente (Fig. 8E; 8K). Abd. III com 1 **ms**, 1 sens **as**, 4 cerdas anteriores (**a2–3** como escamas acessórias, **a5** como tricobótria e **a7** como mes), 6 mediais (**m2** e **m5** como tricobótria, **m3**, **am6** e **pm6** como mac e **m7** como mes) e 4 cerdas posteriores (**p6** como mac, **p7i** e **p6e** como mic e **p7** como mes); cerda **el** presente (Fig. 8F; 8L). Abd. IV com 1 sens anterosubmedial (**as**), 1 sens posterior (**ps**) e pelo menos 10 sensilas mediais; fórmula das cerdas como: 4 'A' (**A1**, **A3**, **A5–6**, **A3** e **A5** como mac) no morfótipo 1 ou 3–4 'A' (**A1**, **A5–6**; **A6** presente ou ausente, **A5–6** como mac) no morfótipo 2, 1 'Ae' (**Ae1**) presente no morfótipo 1, 5 'B' (**B1**, **B3**, **B4–6**, **B4–5** como mac; **B4** mac ou mic no morfótipo 2), 4 'C' (**C1–4**), 6 'T' (**T2–7**), 3 'Te' (**Te3–4**, **Te7?**), 5 'D' (**D1–3p**, **D3** como mac), 4 'E' (**E1–4**, **E2–4** como mac), 3 'F' (**F1–3** mac) e 2 'Fe' (**Fe2**, **Fe5** mac); 9–13 cerdas posteriores e 5–9 pseudoporos (órgãos lenticulares) no morfótipo 1 ou 9–12 cerdas posteriores e 4–8

pseudoporos (órgãos lenticulares) no morfótipo 2 (Fig. 8A; 8D). Abd. V com 1 sens (**as**), 1 sens acessória (**acc.p5**), 4 cerdas anteriores (**a1**, **a3**, **a5–6**, **a5–6** como mac), 5 mediais (**m2–3**, **m5–5e** mac, **m3** raramente como mic no morfótipo 2), 2 postero-anteriores (**p3a–5a**, **p5a** como mic ou mac) e 4 cerdas principais posteriores (**p1**, **p3–5** mac) (Fig. 9B; 9E).

Apêndices (Fig. 10). Subcoxa I do morfótipo 1 com 2 cerdas e 2 pseudoporos; subcoxa II com linha '**a**' com 7–9 e '**p**' com 9 cerdas; subcoxa III com 4–5 e 5–8 cerdas anteriores principais e 2 pseudoporos. Subcoxa I do morfótipo 2 com 4 cerdas e 2 pseudoporos; subcoxa II com linha '**a**' com 7–9 cerdas e '**p**' com 6–7 cerdas; subcoxa III com 4–5 e 7–8 cerdas anteriores principais e 1 pseudoporo. Órgão metatrocanteral com 11–32 no morfótipo 1 ou 21–35 cerdas no morfótipo 2 lisas em forma de espinho (Fig. 10A–B). Fêmur sem cerdas modificadas. Úngues com 3–4 dentes internos, 2 basais simétricos, 1 medial e 1 dente apical, presente ou ausente; face externa com 3 dentes, um dorsal não pareado e dois laterais pareados (Fig. 10C–D). Unguículos lanceolados com lamela postero-externa serrilhada (Fig. 10C–D). *Tenant-hairs* capitados, proporção média unguis: unguiculus: *tenant-hair* = 1: 0,6: 0,7, com valores mínimos e máximos de 1: 0,43–0,73: 0,61–0,91 (Fig. 10C–D). Colóforo anterior com 2+2 ou 3+3 mac distais e 6–7 cerdas ciliadas no morfótipo 1 ou 4–13 cerdas ciliadas no morfótipo 2 (Fig. 10E–F). *Lateral flap* do morfótipo 1 com 6–7 cerdas ciliadas e 5 cerdas lisas (Fig. 10G). *Lateral flap* com 3–6 cerdas ciliadas e 5–6 cerdas lisas (Fig. 10F). Colóforo posterior não observado. Placa manubrial dorsal com 4–5 cerdas e 3 pseudoporos para morfótipo 1 ou 2 pseudoporos no morfótipo 2 (Fig. 10G–H). Manúbrio ventralmente com 1+1 cerdas apicais e 7–8 escamas subapicais. Dens dorsalmente com 23–44 espinhos internos ciliados no morfótipo 1 ou 21–38 no morfótipo 2 e 20–51 no morfótipo 1 espinhos externos ciliados ou 19–34 no morfótipo 2. Mucro curto ou longo (proporção largura: comprimento aproximadamente = 1: 2,5–4,8), com 4 dentes, 3 apicais e 1 basal (Fig. 10K–L).

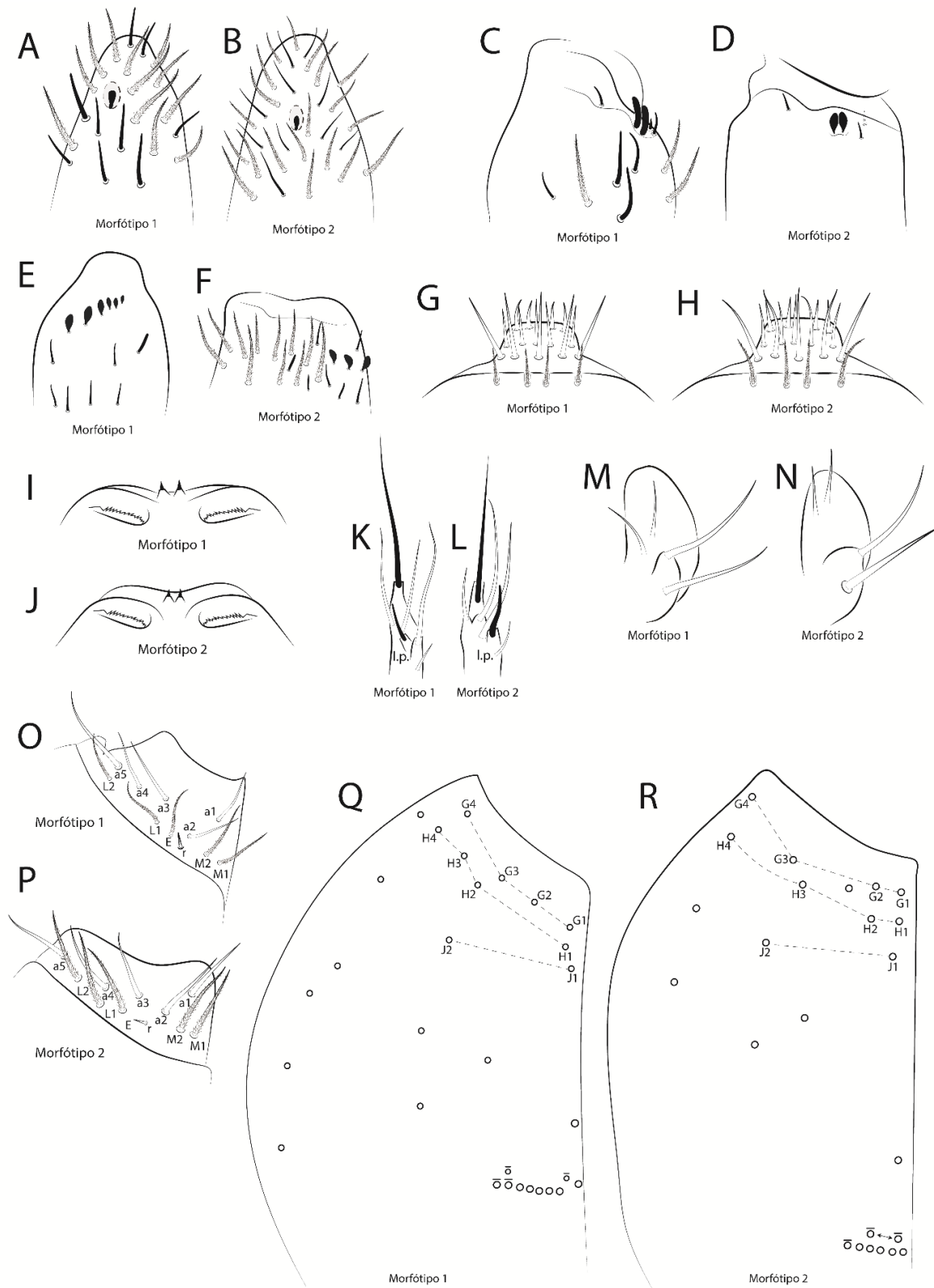


Figura 7. Caracteres morfológicos de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. sp. **A–B**, Ant. IV dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **C–D**, Ant. III dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **E–F**, Ant. II dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **G–H**, Cerdas pre-labrais dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **I–J**, Espinhos labrais dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **K–L**, Papila E dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **M–N**, lobo maxilar externo dos morfótipo 1 e 2, respectivamente. **O–P**, Cerdas labiais dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **Q–R**, Quetotaxia ventral da cabeça dos morfótipos 1 e 2, respectivamente.

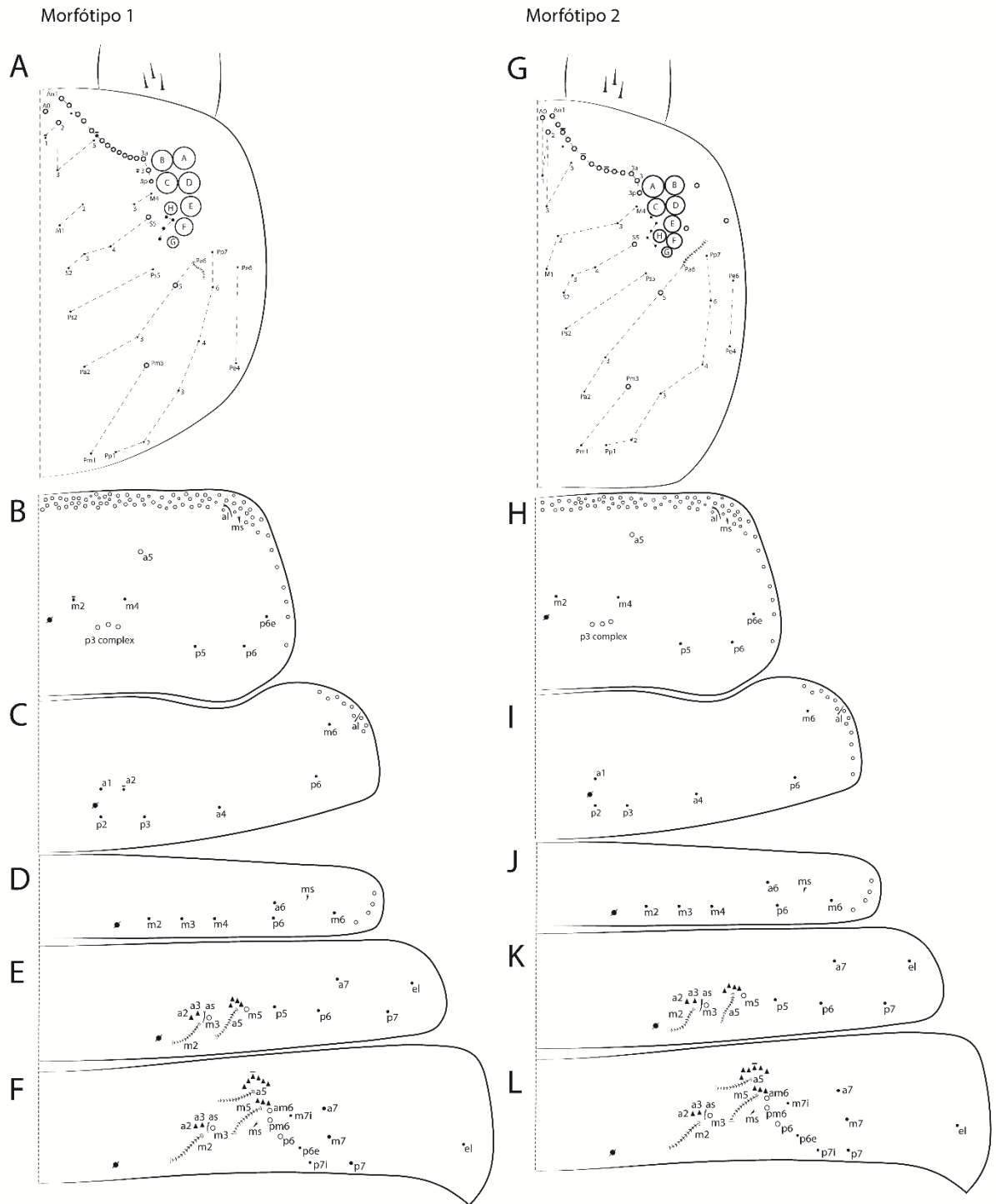


Figura 8. Caracteres morfológicos de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. **A–F**, Quetotaxia dorsal da cabeça e tronco do morfótipo 1. **G–L**, Quetotaxia dorsal da cabeça e tronco do morfótipo 2.

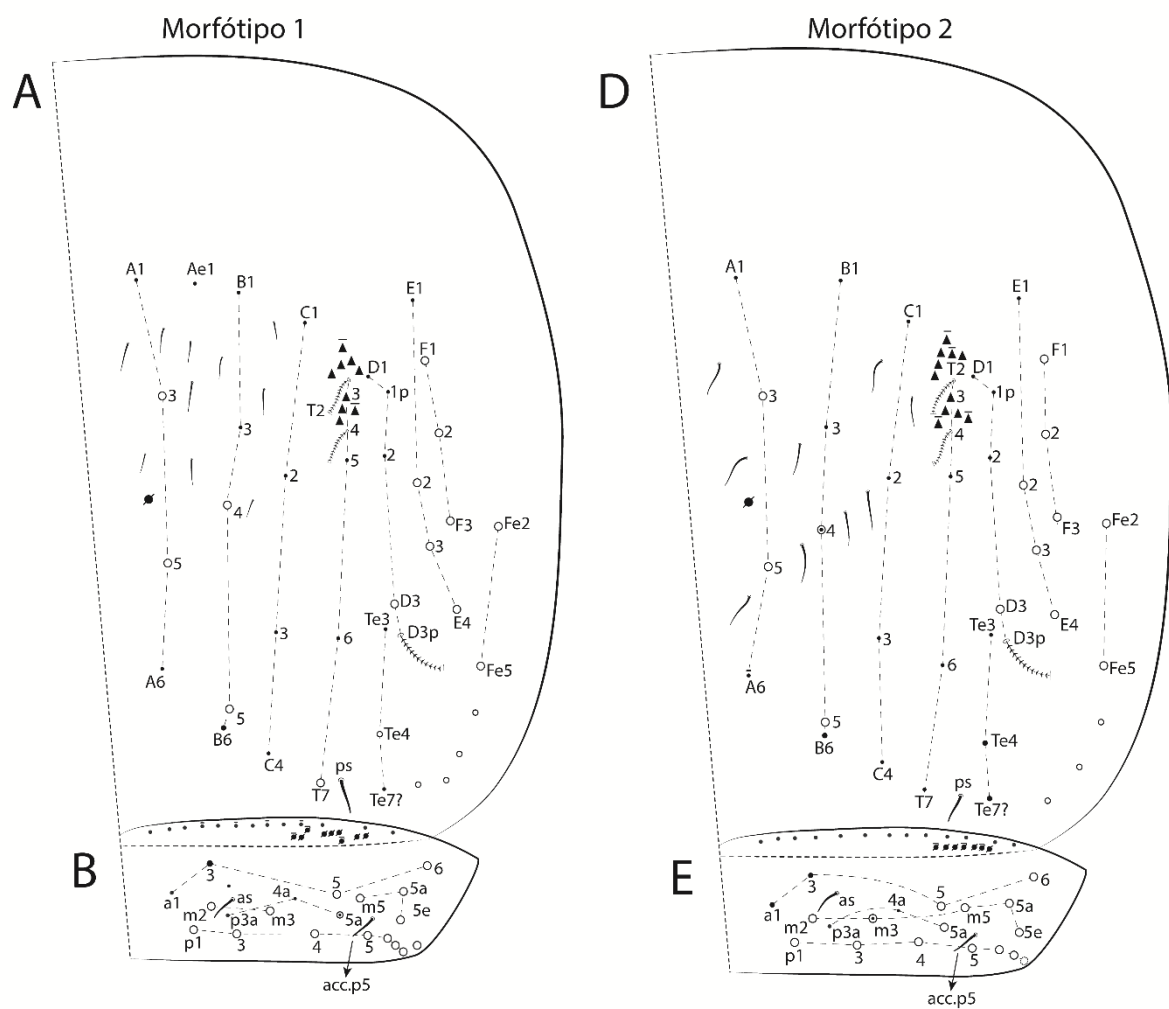


Figura 9. Caracteres morfológicos de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. **A–B**, Abd. IV e V do morfótipo 1. **C–D**, Abd. IV e V do morfótipo 2.

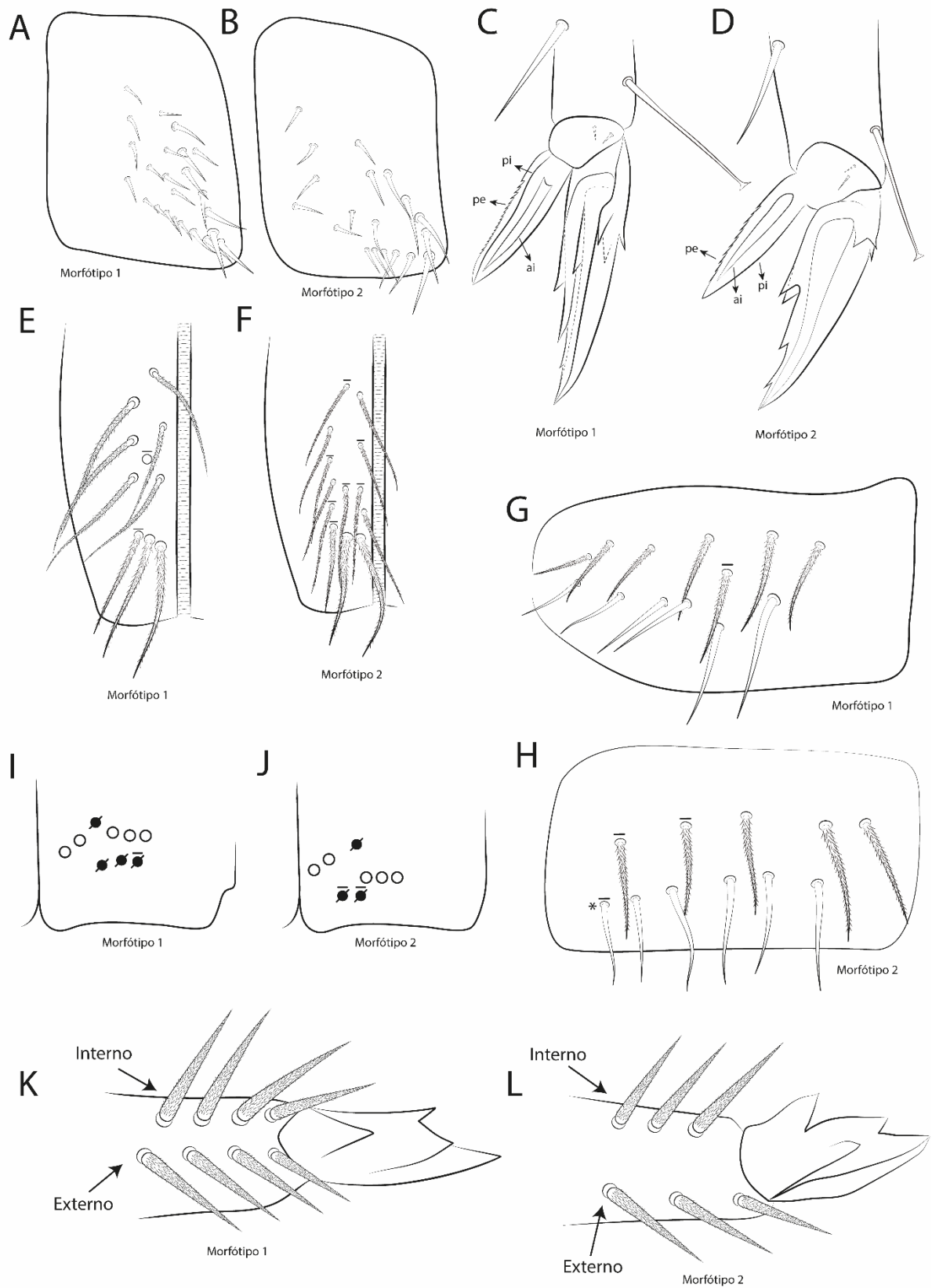


Figura 10. Apêndices de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. **A–B**, Órgão trocanteral dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **C–D**, Complexo empodial dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **E–F**, Colóforo anterior dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **G–H**, *Lateral flap* dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **I–J**, Placa manubrial dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. **K–L**, Mucro e espinhos do dente da fúrcula dos morfótipos 1 e 2, respectivamente. *cerda lisa ou ciliada.

Distribuição e habitat. *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. possui aparente ampla distribuição, sendo encontrada no RN tanto em áreas de Mata Atlântica, quanto em cavernas calcárias da Formação Jandaíra, na Caatinga. Há também registro não publicado da espécie no Cerrado do Tocantins (B. Bellini – comunicação pessoal). Nas cavernas amostradas neste estudo, a espécie pode ser considerada um troglófilo terrestre, devido a sua abundância nas cavidades subterrâneas, especialmente em cavernas com morcegos. Espécimes de *T. zeppelinii* comb. nov. foram frequentemente encontrados próximos a poças de água, sob e sobre rochas, sobre guano e solo úmido das cavidades. É provável que a espécie também ocorra na serapilheira externa às cavernas, de áreas mais conservadas da Caatinga, principalmente em momento mais úmidos do ano.

Quanto a sua distribuição na área inventariada, foi possível encontrar espécimes de *T. zeppelinii* comb. nov. em pelo menos 10 cavernas, sendo apenas três delas (Pedra Lisa, Furna Nova e Furna Feia) protegidas pelo PARNA Furna Feia. Também estão abundantemente distribuídas nas cavernas de Felipe Guerra, entretanto, tais cavernas não se encontram protegidas. Dessa forma, algumas populações cavernícolas de *T. zeppelinii* comb. nov., geneticamente bem estruturadas, estão expostas a ameaças antropogênicas, como agrotóxicos, desmatamento e espeleoturismo desordenado, entre outros impactos ambientais que podem afetar suas dinâmicas populacionais.

Notas taxonômicas. O material tipo de *Lepidonella zeppelinii* Soto-Adames & Bellini, 2015 foi examinado para comparação com os morfotipos de *Trogolaphysa*. As espécies compartilham características semelhantes de habitus e quetotaxia, como a presença de três macroquetas no complexo **p3** do Th. II e **a5** como macroqueta, ausência de macroquetas no Th. III e Abd. I, além de quatro macroquetas no Abd. IV (característica compatível com o morfotipo 1), bem como complexo empodial similares. *L. zeppelinii* difere unicamente pela presença da cerda labial **M3** ciliada, ausente nos morfotipos 1 e 2. Entretanto observamos que essa característica é variável na série tipo de *L. zeppelinii*, e na maior parte dos espécimes a cerda está ausente. Durante a reanálise dos espécimes, observou-se que o labro apresenta espinhos e que o Abd. IV possui uma tricobótria próxima à D3p, características também presentes nos morfotipos 1 e 2. Portanto, *L. zeppelinii* deve ser atribuída ao gênero *Trogolaphysa*.

Indivíduos polimórficos de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. das cavernas potiguares possuem 2, 3 ou 5 cerdas em apenas um lado do Abd. IV. Três indivíduos apresentam **A3**, **A5** ou **B4** como ausentes ou como mic e um indivíduo com 5+4 mac centrais

no Abd. IV. Neste caso, a cerda extra está alinhada ao pseudoporo central e acima de **A5**, indicando provavelmente a homologia com a mac **A4**. Os espécimes do morfótipo 1 tipicamente possuem 3 pseudoporos na placa manubrial, entretanto, um único espécime polimórfico possui 4 pseudoporos no lado direito, com o outro lado não visualizado devido à posição do espécime e artefatos de montagem. Um espécime polimórfico do morfótipo 2 possui 2 mac no complexo **p3** em apenas um dos lados do Th. II (1 ind. da caverna Bota), sendo a terceira macroqueta deste complexo uma microcerda. Os espécimes de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. possuem 2 pseudoporos na placa manubrial, no entanto, três espécimes polimórficos da caverna Urubu possuem variação nessa região, sendo um indivíduo com 1 pseudoporo e dois indivíduos com 3 pseudoporos em apenas um lado da placa.

Consideramos essas variações morfológicas apresentadas para os dois morfótipos cavernícolas como menos importantes, já que a maioria dos espécimes estudados (86%, 48 espécimes) possuem estabilidade nestes caracteres, e os espécimes com variação são assimétricos, com um lado apresentando a morfologia do restante da população (1 ind. com 4+3 mac no Abd. IV e 1 ind. com 4 pseudoporos na placa manubrial). Tais assimetrias devem representar menor valor taxonômico/sistemático, tendo em vista que destoam do padrão geral de quetotaxia da população estudada (Palacios-Vargas 1980), e, portanto, não foram consideradas como características diagnósticas ou descritivas para a espécie.

5 DISCUSSÃO

5.1 Taxonomia integrativa para validação de espécies

A integração de novas ferramentas para delimitação de espécies tornou a taxonomia integrativa uma abordagem fundamental na compreensão e descrição de táxons crípticos. A definição de espécie críptica é frequentemente associada à similaridade morfológica de suas diferentes populações que, no entanto, apresentam distinção genética, assim como foi observada para as populações cavernícolas de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. neste estudo (Bickford *et al.* 2007). Métodos baseados em DNA são cruciais para identificar e compreender a diversidade críptica, fornecendo suporte aos taxonomistas na identificação de padrões e na reavaliação de caracteres morfológicos que, muitas vezes, não são considerados na descrição de espécies, sendo fundamental a escolha apropriada de caracteres diagnósticos ao invés de quantidade de caracteres (Jörger & Schrödl, 2013; Fišer *et al.* 2018; Korshunova *et al.* 2019).

A homologia das cerdas descrita por Szeptycki (1979) é utilizada em parte para a identificação e descrição de espécies de Entomobryoidea. Parte das macroquetas da cabeça e

do tronco são cerdas primárias que estão presentes desde os primeiros ínstaes do indivíduo. O morfótipo 1 de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. apresenta frequentemente a cerda **B4** no Abd. IV como macroqueta, enquanto no morfótipo 2 esta cerda é frequentemente uma microqueta. Apesar dessa diferença, a presença de pelo menos um indivíduo polimórfico nas duas populações demonstra a sobreposição das características entre os dois grupos, indicando que os diferentes estados deste caractere ainda não são estáveis nas populações amostradas. A cerda **B4** do Abd. IV e os pseudoporos da placa manubrial são potenciais caracteres diagnósticos para a distinção das populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. presentes nas cavernas do RN. Entretanto, as sutis variações observadas entre elas (*i.e.* tamanho do mucro, a morfologia de cerdas no tronco e de pseudoporos na placa manubrial) podem ser resultantes de variações intraespecíficas.

A divergência genética frequentemente utilizada para tratar espécies como distintas em Collembola é de 5% (Porco *et al.* 2012a; Porco *et al.* 2013), com média da distância genética interespecífica de 15% (Katz *et al.* 2015; Sun *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019). Esta distância pode variar de acordo com o gênero e espécies alvo do estudo, e espécies de *Lepidocyrtus* e *Entomobrya* Rondani, 1861 utilizadas em estudos integrativos apresentaram valores intraespecíficos de 15–25% entre populações geograficamente distantes da mesma espécie (Zhang *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019). Por outro lado, como apresentado por Sun *et al.* (2018), *Thalassaphorura debilis* (Moniez, 1890) e *T. thalassophila* (Bagnall, 1937) apresentam baixa divergência genética (~4%), assim como populações de *T. thalassophila* da França e da Escócia, separadas por 660 km de distância, apresentando apenas 0.3% de divergência genética para COX1. Mesmo assim, por apresentarem morfologia claramente distante, ainda são tratadas como espécies distintas (Sun *et al.* 2018).

Populações de Collembola que apresentam distâncias genéticas de 8% a 15% para o marcador COX1 são frequentemente reconhecidas como espécies ou linhagens distintas, especialmente quando há caracteres morfológicos que permitem diferenciá-los, ou outras fontes de evidências, como a distribuição geográfica e dados ecológicos (Katz *et al.* 2015; Katz *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2018). No entanto, a delimitação de alguns táxons é desafiadora, como apresentado por Cicconardi *et al.* (2010), que investigaram a estrutura filogeográfica de três espécies comuns do gênero *Lepidocyrtus* na costa da França, Itália e em ilhas próximas localizadas na bacia do Mediterrâneo. Apesar do estudo apresentar numerosas linhagens genéticas profundamente divergentes, muitas delas antigas e isoladas mesmo em curtas distâncias, os autores sugerem que a diversidade de espécies morfológicas atualmente

reconhecidas podem estar subestimadas, ocultando a verdadeira biodiversidade de colêmbolos nesta região. Isso reforça que a morfologia externa sozinha não é suficiente para identificar táxons em algumas circunstâncias, como quando são avaliadas espécies crípticas ou pseudocrípticas, levando autores a utilizar o termo “linhagem” para esses clados (Cicconardi *et al.* 2010; Porco *et al.* 2012b).

Apesar das distâncias genéticas entre as populações de FF, FN e PL (população-norte) e de CJC, ARA, BOT, URU, CAR, BOA e TLG (população-sul) serem entre 17% e 20% para o marcador COX1 (Tab. 5), sugestivo para delimitação espécies distintas, consideramos não haver diferenças morfológicas evidentes e fidedignas suficientes para separação de morfotipos ou OTUs de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. em diferentes espécies neste momento. Os resultados da AMOVA sugerem que, apesar de haver alguma variação entre as populações dentro dos grupos de cavernas, a maior parte da variabilidade genética está concentrada nas diferenças entre os grupos de cavernas nas porções Norte e Sul da região amostrada. Isso sugere que barreiras geográficas limitam o fluxo gênico entre essas regiões, provavelmente devido à baixa capacidade de dispersão dos organismos estudados.

A região calcária da Formação Jandaíra, onde estão localizadas as cavernas deste estudo, facilita a percolação da água para o aquífero Jandaíra (Carneiro *et al.* 2015; Bagni *et al.* 2020). Isto levanta a hipótese de que a água subterrânea possa atuar tanto como uma barreira física à dispersão, dependendo da profundidade do aquífero nas áreas das cavernas, ou como um facilitador, quando ocorre alagamento durante chuvas intensas. O movimento da água, juntamente com ilhas de depósitos orgânicos em sua superfície, pode servir como um meio de dispersão para colêmbolos ou outros microartrópodes, promovendo o fluxo gênico entre cavernas próximas (Schuppenhauer *et al.* 2019).

Em geral, as hipóteses que explicam os mecanismos de diversidade críptica estão relacionadas à especiação recente e ao conservadorismo de nicho (Fišer *et al.* 2018). A baixa diferenciação morfológica das populações de *Trogolaphysa* poderia ser explicada pelo conservadorismo de nicho filogenético. Esta hipótese possui princípios que restringem a variação genética, como a seleção natural estabilizadora, quando os fenótipos intermediários mais frequentes de uma população são selecionados, e efeitos pleiotrópicos, isto é, quando um único gene expressa diversas características de um fenótipo, que muitas vezes não estão relacionadas (Fišer *et al.* 2018).

A maioria das OTUs de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. se diversificou nos últimos três milhões de anos (Ma) (Fig. 5), o que pode indicar que as populações passaram a

habitar cavernas mais recentemente, ou que as populações não estão inteiramente isoladas reprodutivamente. Isso explicaria a razão pela qual as linhagens ainda não apresentam características morfológicas distintas, de acordo com a hipótese de especiação recente (Fišer *et al.* 2018). Sendo assim, apesar do DNA mitocondrial revelar estruturação populacional e aparente isolamento reprodutivo entre a população ao norte (FF, FN e PL) e as demais cavernas ao sul (CJC, ARA, BOT, URU, CAR, BOA e TLG), não é possível afirmar a ausência de reprodução entre os indivíduos das OTUs, uma vez que o conceito biológico de espécie não foi experimentado (Mayr, 1942).

5.2 Avaliação do risco de extinção

O delineamento do complexo de espécies crípticas de *Trogolaphysa* evidencia diversidade genética oculta no gênero e apresenta um desafio para a compreensão dos limites entre os ritmos de diferenciação morfológica e molecular das espécies de Collembola. Essa desincronia entre os processos de diferenciação dificulta a interpretação dos resultados obtidos pelos dados de distância genética. Ao padronizar os limites de variação intraespecífica e interespecífica para respectivamente 5% e 8%, as análises comparativas de DNA, principalmente em análises *metabarcoding* utilizando DNA ambiental, podem revelar resultados inconsistentes, identificando espécies diferentes que, na verdade, são espécies crípticas (Sun, Bedos & Deharveng 2018; Katz *et al.* 2015; Pedro *et al.* 2023). Por outro lado, identificar estas espécies baseadas apenas na morfologia pode incorporar mais riscos à extinção de sua diversidade genética.

A espécie *T. zeppelinii* comb. nov. está amplamente distribuído no RN, com ocorrências tanto em remanescentes de Mata Atlântica, nos municípios de Macaíba e Natal, onde foi originalmente descrito, quanto em cavernas inseridas no bioma Caatinga (Soto-Adames & Bellini 2015). Dada essa ampla distribuição e os diferentes ambientes ocupados, a identificação morfológica não se mostra suficiente para fins de conservação dessas linhagens. Isso se deve ao fato de colêmbolos serem organismos pequenos e com baixa capacidade de dispersão, o que favorece o isolamento das populações. Assim, é provável que as populações presentes na Mata Atlântica sejam geneticamente distantes daquelas encontradas nas cavernas, apesar da sua semelhança morfológica. As populações de *T. zeppelinii* comb. nov. das cavernas inventariadas poderiam ser classificadas temporariamente como unidades evolutivamente significativas, ou subpopulações, e avaliadas individualmente quanto ao risco de extinção.

Entretanto, como *T. zeppelinii* comb. nov. também ocorre em remanescentes de Mata Atlântica, cujas populações não foram incluídas neste estudo, e ainda não existem dados genéticos disponíveis para comparação entre esses grupos, não é possível determinar com segurança o grau de diferenciação genética entre as populações da Caatinga e da Mata Atlântica. Dessa forma, seguindo os protocolos da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN), esta espécie provavelmente seria classificada como “Pouco Preocupante” (*Least Concern* – LC), até que novos estudos genéticos e biogeográficos possibilitem uma avaliação mais precisa das linhagens cavernícolas, da mata atlântica e sua possível vulnerabilidade à extinção.

No entanto, considerando que o país é signatário da Convenção da Diversidade Biológicas (Decreto Legislativo nº 2 de 1994 promulgado pelo Decreto Federal 2519 de 1998), a conservação de linhagens genéticas de espécies é objeto de leis federais e sua conservação está incluída na Política Nacional da Biodiversidade (Decreto nº 4.339/2002), a qual deve promover a conservação “[...] *in situ* e *ex situ* de variabilidade genética, de ecossistemas, incluindo os serviços ambientais, e de espécies, particularmente daquelas ameaçadas ou com potencial econômico [...]”. Sendo assim, a legislação brasileira não se restringe apenas às espécies, mas também às variedades genéticas. Portanto, apesar de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. poder ser considerada atualmente como “Pouco Preocupante” (*Least Concern* – LC), a conservação das áreas em que habita é importante para que suas populações, juntamente com suas variações genéticas locais, possam ser preservadas.

Por fim, é válido ressaltar que nosso estudo corroborou em parte com nossas hipóteses prévias, demonstrando que as populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. da mesma caverna, ou de cavernas próximas, apresentam maior similaridade morfológica e molecular entre si do que com populações mais distantes. De fato, a variação morfológica das populações da espécie observadas neste estudo foi mínima, o que se tornou um critério relevante para decidirmos pela não fragmentação do táxon em diferentes espécies. Por outro lado, observamos clara estruturação populacional do ponto de vista molecular, sugerindo que populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. abrigadas em diferentes cavidades estão em processo de isolamento reprodutivo, que já se reflete em variabilidade genética interpopulacional.

6 CONCLUSÃO

O recente aumento na identificação de espécies crípticas de Collembola, devido ao emprego de métodos moleculares, ressalta a necessidade de abordagens integradas de diferentes métodos de delimitação taxonômica, visando a a conservação da biodiversidade de alguns táxons de Collembola, especialmente àqueles com morfologia conservada, como nas populações de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. Reconhecer e identificar estas espécies auxilia na compreensão sobre a diversidade biológica, além de ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias de proteção e conservação, principalmente em áreas não protegidas. A perda de biodiversidade pode ser acelerada se espécies distintas forem tratadas como homogêneas, levando a lacunas nas políticas de proteção e manejo. Portanto, é importante que taxonomistas utilizem, sempre que possível, técnicas e análises moleculares em suas práticas, garantindo que a diversidade potencial das espécies seja reconhecida e adequadamente preservada.

Os resultados deste capítulo permitem concluir que a espécie *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. deve ser considerada uma espécie única, porém suas linhagens devem ser protegidas. Os indivíduos que habitam as cavernas FN, FF e PL estão protegidos dentro do Parque Nacional da Fuma Feia, enquanto as demais cavernas estão sujeitas a impactos ambientais por se encontrarem em áreas particulares. Assim, é crucial monitorar as atividades humanas que possam impactar tais cavernas, considerando que os dados moleculares apresentados neste capítulo. A identificação dessas diferenças genéticas e morfológicas é fundamental para a preservação da riqueza genética de espécies e para o entendimento mais profundo da biodiversidade presente em ecossistemas cavernícolas.

REFERÊNCIAS

- Angelim, L.A.D.A. (2006). *Geologia e recursos minerais do estado do Rio Grande do Norte*. CPRM; FAPERN.
- Arlé, R., & Guimaraes, A. E. (1979). A new species of the genus *Paronella* Schott, 1893 from Rio de Janeiro (Collembola). *Revista brasileira de entomologia*.
- Bagni, F. L., Bezerra, F. H., Balsamo, F., Maia, R. P., & Dall'Aglio, M. (2020). Karst dissolution along fracture corridors in an anticline hinge, Jandaíra Formation, Brazil: Implications for reservoir quality. *Marine and Petroleum Geology*, 115, 104249.
- Bellini, B. C., & Cipola, N. G. (2017). The Neotropical genera of Paronellinae (Collembola, Entomobryoidea, Paronellidae) with description of two new species and redescription of *Campylothorax mitrai*. *Zootaxa*, 4300(2), 151-179.

Bento, D. M., Ferreira, R. L., Vasconcelos, S., Lima, J. L. R., Oliveira, G., Silva, T. C., & Lima, S. M. Q. (2024). Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid. *Biodiversity and Conservation*, 1-26.

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

Bickford, David, *et al.* (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution* 22, 3, 148-155.

Börner, C. (1906) Das system der Collembolen neuer Collembolen des Hamburger Naturhistorischen Museums. *Mitteilungen aus den Naturhistorischen Museum in Hamburg*, 23, 147–188.

Börner, C. (1913) Die Familien der Collembolen. *Zoologischer Anzeiger* 41, 315–322.

Bourlet, A. (1839) Mémoire sur les Podures. *Mémoires de la Société Royale des Sciences, de L'Agriculture et des Arts de Lille*, 1, 377–417.

Carneiro, M. A., Bezerra, F. H. R., da SILVA, C. C. N., Pinheiro, R., & Cazarin, C. L. (2015). Controle estrutural do sistema cárstico epigenético na Formação Jandaíra, bacia potiguar. *Geociências*, 34(2), 199-209.

Chamberlain, S., & Sagouis, A. (2021). parzer: Parse coordinates. *R package version 0.5.1*. <https://CRAN.R-project.org/package=parzer>

Cicconardi, F., Fanciulli, P. P., & Emerson, B. C. (2013). Collembola, the biological species concept and the underestimation of global species richness. *Molecular ecology* 22(21), 5382-5396.

Cicconardi, F., Nardi, F., Emerson, B. C., Frati, F., & Fanciulli, P. P. (2010). Deep phylogeographic divisions and long-term persistence of forest invertebrates (Hexapoda: Collembola) in the North-Western Mediterranean basin. *Molecular Ecology*, 19(2), 386-400.

Cipola, N. G., Morais, J. W., & Bellini, B. C. (2022). Survey of *Trogolaphysa* Mills (Collembola, Paronellidae) of the Brazilian Amazon, including five new species and the description of the dorsal chaetotaxy of the first instar. *Zootaxa*, 5093(3), 251-295. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5093.3.1>.

Cipola, N.G., De Morais, J.W. & Bellini, B.C. (2014) Two new species of *Seira* Lubbock (Collembola, Entomobryidae, Seirini) from South Brazil. *Zootaxa*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3793.1.7>

Clement, M., Snell, Q., Walke, P., Posada, D. Crandall, K. (2002). TCS Networks: estimating gene genealogies. *International Parallel and Distributed Processing Symposium* 2,184.

Decreto Legislativo nº 2, de 3 de fevereiro de 1994. Aprova o texto da Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada no Rio de Janeiro, de 5 a 14 de junho de 1992. Promulgado pelo Decreto Federal nº 2.519, de 16 de março de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

Deharveng, L., Jantarit, S., & Bedos, A. (2018) Revisiting *Lepidonella* Yosii (Collembola: Paronellidae): character overview, checklist of world species and reassessment

of *Pseudoparonella doveri* Carpenter. *Annales de la Société entomologique de France* 54(5), 381-400.

Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

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

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

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

Fjellberg, A. (1999) The Labial Palp in Collembola. *Zoologischer Anzeiger*, 237, 309-330.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. (1994). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Folsom, J.W. (1927) Insects of the subclass Apterygota from Central America and the West Indies. *Proceedings of the United States National Museum*, 2701(1), 1–16. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.72-2702.1>

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62, 707–724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>

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

Giribet, G., Edgecombe, G. D., & Wheeler, W. C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature*, 413(6852), 157–161. doi: 10.1038/35093097

Gisin, H. (1967) Espèces nouvelles et lignées évolutives de *Pseudosinella* endogés. *Memórias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra* 301, 5–25.

Giulietti, A. M., Bocage Neta, A. L., Castro, A. A. J. F., Gamarra-Rojas, C. F. L., Sampaio, E. V. S. B., Virgínio, J. F., ... & Harley, R. M. (2004). Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Guzik, M. T., Stevens, M. I., Cooper, S. J., Humphreys, W. F., & Austin, A. D. (2021). Extreme genetic diversity among springtails (Collembola) in subterranean calcretes of arid Australia. *Genome* 64(3), 181-195.

Hijmans, R. J. (2022). geosphere: Spherical Trigonometry. *R package version 1.5-14*. <https://CRAN.R-project.org/package=geosphere>

Hoch, H., & Ferreira, R. L. (2013) *Potiguara troglobia* gen. n., sp. n.–first record of a troglobitic Kinnaridae from Brazil (Hemiptera: Fulgoromorpha). *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 60(1), 33-40.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2020) Plano de Manejo do Parque Nacional da Fuma Feia. Brasília: ICMBio, 57 pp.

Jacquemart, S. (1980) Collemboles entomobryens nouveaux d'Afrique centrale. *Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique* 52, 1–15.

Jordana, R., Arbea, J.I., Simón, C. & Luciáñez, M.J. (1997) Collembola, Poduromorpha. Fauna Iberica. Vol. 8. *Museo Nacional de Ciencias Naturales*. Madrid, pp. 807.

Jörger, K. M., & Schrödl, M. (2013). How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* 10, 1-27.

Juan, C. & Emerson, B.C. (2010) Evolution underground: Shedding light on the diversification of subterranean insects. *Journal of Biology* 9, 227. <https://doi.org/10.1186/jbiol227>.

Juan, C., Guzik, M.T., Jaume, D. & Cooper, S.J.B. (2010) Evolution in caves: Darwin's "wrecks of ancient life" in the molecular era. *Molecular Ecology* 19, 3865–3880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04759.x>

Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., Flouri, T. (2017) Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo, *Bioinformatics* 33(11) 1630–1638, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT: multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30(4), 772-780.

Katz, A. D. (2020). Inferring evolutionary timescales without independent timing information: An assessment of "universal" insect rates to calibrate a Collembola (Hexapoda) molecular clock. *Genes* 11(10), 1172.

Katz, A. D., Giordano, R., & Soto-Adames, F. N. (2015). Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 173(4), 818-840.

Katz, A. D., Taylor, S. J., & Davis, M. A. (2018). At the confluence of vicariance and dispersal: Phylogeography of cavernicolous springtails (Collembola: Arrhopalitidae, Tomoceridae) codistributed across a geologically complex karst landscape in Illinois and Missouri. *Ecology and Evolution* 8(20), 10306-10325.

Kearse *et al.* (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12), 1647-1649.

Korshunova, T. *et al.* (2019). Multilevel fine-scale diversity challenges the 'cryptic species' concept. *Scientific Reports* 9(1), 6732.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15, 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>

Kováč, Ľ., Žurovcová, M., Raschmanová, N., Jureková, N., Papáč, V., & Parimuchová, A. (2023). Troglomorphic adaptations on the northern European frontier: the phylogeny of the

cave *Pseudosinella* (Hexapoda, Collembola) in the Western Carpathians. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1169911.

Mari-Mutt, J.A. (1979) A revision of the genus *Dicranocentrus* Schött (Insecta: Collembola: Entomobryidae). *Agricultural Experiment Station Bulletin* 259, 1–79.

Mari-Mutt, J.A.. (1986) Puerto Rican species of *Lepidocyrtus* and *Pseudosinella* (Collembola: Entomobryidae). *Caribbean Journal of Science* 22, 43–47.

Mateos, E., Winkler, D., Riutort, M. & Álvarez-Presas, M. (2021) New morphological and molecular data reveal an important underestimation of species diversity and indicate evolutionary patterns in European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae). *Invertebrate Systematics*, 35 (5), 471–492. <https://doi.org/10.1071/IS20016>.

Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species from the viewpoint of a zoologist* (Columbia Univ. Press, New York), pp 334.

Mills, H.B. (1938) *Collembola from Yucatan Caves*. In: Fauna of the caves of Yucatan. Carnegie Institution of Washington Publication, pp. 183–190.

Moniez R. 1890. Acariens et insectes marins des co^tes du Boulonnais. *Revue Biologique du Nord de la France*, 2, 338–350.

Nunes, R. C., & Bellini, B. C. (2018). Three new species of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha) from Brazilian Caatinga-Cerrado transition, with identification keys to Brazilian *Cyphoderus*, *Pseudosinella* and *Trogolaphysa* species. *Zootaxa*, 4420(1), 71–96.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2024). vegan: Community Ecology Package. *R package version 2.6-4*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Pedro, P. M., Cullen Jr., L., Prado, F., Uezu, A., Piper, R., Faria, C. M. A., Knogge, C., Razzolini, M. R. P., Paiva, M. B., Dropa, M., Silva, M., Rech, T. C. & Püttker, T. Ecological monitoring using Collembola metabarcoding with extremely low bycatch amplification. *Ecological Indicators*, v. 157, p. 111202, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111202>

Porco, D., Bedos, A., Greenslade, P., Janion, C., Skarżyński, D., Stevens, M. I., Jansen van Vuuren, B. & Deharveng, L.. (2012a). Challenging species delimitation in Collembola: cryptic diversity among common springtails unveiled by DNA barcoding. *Invertebrate Systematics*, 26(6), 470–477.

Porco, D., Decaëns, T., Deharveng, L., James, S. W., Skarżyński, D., Erséus, C., Butt, K. R., Benoit, R. & Hebert, P. D. N. (2013). Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biological Invasions*, 15, 899–910.

Porco, D., Potapov, M., Bedos, A., Busmachiu, G., Weiner, W. M., Hamra-Kroua, S., & Deharveng, L. (2012b). Cryptic diversity in the ubiquitous species *Parisetoma notabilis* (Collembola, Isotomidae): a long-used chimeric species? *PLoS ONE*, 7(9), e46056, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046056>.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609–620.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. J. M. E. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877.
- QGIS Development Team, (2024). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Rondani, C. (1861) *Entomobrya pro Degeeria* Nic. In: Stocche, A. (Ed.), *Dipterologiae Italicae Prodromus*, 4, pp. 40.
- Ronquist *et al.* (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Schäffer, C. (1897) Apterygoten. Hamburger Magalhaensische Sammelreise, 1–48.
- Schuppenhauer, M. M., Lehmitz, R., & Xylander, W. E. (2019). Slow-moving soil organisms on a water highway: aquatic dispersal and survival potential of Oribatida and Collembola in running water. *Movement Ecology*, 7, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40462-019-0165-5>.
- Sinnott, R. W. (1984). Virtues of the Haversine. *Sky and telescope*, 68(2), 158.
- Soto-Adames, F. N., & Bellini, B. C. (2015). Dorsal chaetotaxy of neotropical species supports a basal position for the genus *Lepidonella* among scaled Paronellidae (Collembola, Entomobryoidea). *Florida Entomologist*, 98(1), 330-341. <https://doi.org/10.1653/024.098.0152>
- Soto-Adames, F. N., Jordana, R., & Baquero, E. (2014). Comparative analysis of the dorsal chaetotaxy of *Troglopedetes*, *Trogolaphysa*, and *Campylothorax* supports the synonymization of tribes Paronellini and Troglopedetini (Collembola: Paronellidae). *Journal of Insect Science*, 14(1), 278.
- Soto-Adames, F., Daly, K. M., & Wynne, J. J. (2024). Synopsis of Neotropical *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Collembola: Paronellidae) with Reduced Eye Number, and Description of Two New Trogllobiontic Species from Belize. *Taxonomy*, 4(1), 199–236. <https://doi.org/10.3390/taxonomy4010011>
- Soto-Adames, F.N. & Taylor, S.J. (2013) The dorsal chaetotaxy of *Trogolaphysa* (Collembola, Paronellidae), with descriptions of two new species from caves in Belize. *ZooKeys* 323, 35–74. <https://doi.org/10.3897/zookeys.323.4950>
- Soto-Adames, F.N. (2015) The dorsal chaetotaxy of first instar *Trogolaphysa jataca*, with description of twelve new species of neotropical *Trogolaphysa* (Hexapoda: Collembola: Paronellidae). *Zootaxa* 4032, 1–41. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4032.1.1>
- Soto-Adames, F.N., Barra, J.-A.A., Christiansen, K. & Jordana, R. (2008) Suprageneric Classification of Collembola Entomobryomorpha. *Annals of the Entomological Society of America* 101, 501–513.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Sun, X., Bedos, A., & Deharveng, L. (2018). Unusually low genetic divergence at COI barcode locus between two species of intertidal *Thalassaphorura* (Collembola: Onychiuridae). *PeerJ*, 6, e5021.

Szeptycki, A. (1979). Chaetotaxy of the Entomobryidae and Its Phylogenetical Significance - Morpho-Systematic Studies on Collembola IV. Polska Akademia Nauk, Zakład Zoologii Systematycznej i Doświadczalnej 4, 213.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022–3027.

Utida *et al.* (2020). Climate changes in Northeastern Brazil from deglacial to Meghalayan periods and related environmental impacts. *Quaternary Science Reviews*, 250, 106655.

Whiting, M.F., Carpenter, J.M., Wheeler, Q.D., Wheeler, W.C., 1997. The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 46, 1–68.

Wickham, H., *et al.* (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Winkler, D., Mateos, E., Traser, G., Lakatos, F., & Tóth, V. (2020). New insight into the systematics of European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae) using molecular and morphological data. *Insects*, 11(5), 302.

Womersley, H. (1934) A preliminary account of the Collembola-Arthropleona of Australia, Part II, Superfamily Entomobryoidea. *Transactions of the Royal Society of South Australia* 58, 86–138.

Xiong, Y., Gao, Y., Yin, W.-Y., Luan, Y.-X., 2008. Molecular phylogeny of Collembola inferred from ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics Evolution* 49, 728–735.

Yosii, R. (1960) On some Collembola of New Caledonia, New Britain and Solomon Islands. *Bulletin of the Osaka Museum of Natural History*, 12, 9–38.

Yu, D., Qin, C., Ding, Y., Hu, F., Zhang, F., & Liu, M. (2018). Revealing species diversity of *Tomocerus ocreatus* complex (Collembola: Tomoceridae): integrative species delimitation and evaluation of taxonomic characters. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 76(1), 147–172.

Zeppelini, D., Oliveira, J. V. L., de Lima, E. C. A., Brito, R. A., Ferreira, A. S., Stievano, L. C., Brito, N. P., Oliveira-Neto, M. A. & Lopes, B. C. (2022). Hotspot in ferruginous rock may have serious implications in Brazilian conservation policy. *Scientific Reports*, 12(1), 14871.

Zeppelini, D., Queiroz, G. C., Bellini, B.C., Brito, R. A., Oliveira, J. V. L. C., Lopes, B. C. H., Lima, E. C. A., Ferreira, A. S., Brito, N. P. (2025). Entomobryidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/16768>>. Acesso em: 10 jul. 2025

Zhang, B., Chen, T. W., Mateos, E., Scheu, S., & Schaefer, I. (2019). DNA-based approaches uncover cryptic diversity in the European *Lepidocyrtus lanuginosus* species group (Collembola: Entomobryidae). *Invertebrate Systematics* 33(4), 661-670.

Zhang, F., Jantarit, S., Nilsai, A., Stevens, M.I., Ding, Y. & Satasook, C. (2018) Species delimitation in the morphologically conserved *Coecobrya* (Collembola: Entomobryidae): A

case study integrating morphology and molecular traits to advance current taxonomy. *Zoologica Scripta* 47(3), 342–356. <https://doi.org/10.1111/zsc.12279>

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt499

Capítulo 2 – Mitogenoma completo e posição filogenética de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. (Entomobryidae, Collembola)

Resumo

Os bancos de dados genômicos possuem vieses relacionados a amostragem desigual de táxons ao redor do globo. A maioria dos mitogenomas disponíveis nos repositórios são de organismos coletados na Europa e Ásia. A ordem Entomobryomorpha, composta por cinco famílias, inclui Entomobryidae como a mais diversa. Dentro desta, a subfamília Paronellinae possui poucos dados genéticos disponíveis, limitando as análises filogenéticas robustas. O objetivo deste estudo foi apresentar o novo mitogenoma completo de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. e investigar as relações filogenéticas internas da subfamília Paronellinae (Entomobryidae), com ênfase em representantes da região Neotropical. O DNA de *T. zeppelinii* foi extraído a partir de indivíduos coletados na caverna Furna Feia, Rio Grande do Norte, Brasil. Os dados brutos do sequenciamento (4,5 Gb) foram reduzidos a 2,5 Gb e o mitogenoma foi montado com o software NOVOPlasty e anotado com o MitoZ. As sequências dos genes codificadores de proteínas (CDS) e rRNA foram extraídas e traduzidas com o TransDecoder. Os alinhamentos foram realizados com o MAFFT e refinados com o trimAl. As supermatrizes geradas foram utilizadas para inferência filogenética de máxima verossimilhança, com seleção de modelos evolutivos específicos por gene. O mitogenoma de *T. zeppelinii* possui 14.822 pares de bases, contendo 13 genes CDS, 22 tRNAs e 2 rRNAs, totalizando 37 genes, sem inversões ou perdas em relação ao modelo de Pancrustacea. A análise filogenética possui um total de 20 espécies, sendo 11 brasileiras. As filogenias baseadas em aminoácidos e nucleotídeos suportam o monofiletismo das subfamílias Paronellinae, Seirinae, Lepidocyrtinae e Paronellidinae. Contudo, Entomobryinae não foi recuperada como monofilética. Para o estabelecimento das relações internas dos Paronellinae, é necessário a inclusão de mais mitogenomas de *Cyphoderus*, assim como de outros gêneros representantes de Paronellinae. O novo mitogenoma amplia a diversidade genômica de Collembola na região Neotropical e reforça o potencial dos mitogenomas como ferramenta para inferências filogenéticas robustas. A inclusão de *T. zeppelinii* contribui significativamente para a resolução das relações internas de Paronellinae e destaca a importância de expandir a amostragem genética para além das regiões asiáticas e europeias.

Palavras-chave: Paronellinae, evolução, biodiversidade Neotropical, taxonomia integrativa.

1 INTRODUÇÃO

A ordem Entomobryomorpha é composta por cinco famílias *sensu* Bellini *et al.* 2022: Tomoceridae, Actaletidae, Isotomidae, Orchesellidae e Entomobryidae, sendo esta última a mais representativa quanto ao número de espécies (Bellinger *et al.* 1996-2024). Em Entomobryidae, os estudos sistemáticos de Godeiro *et al.* (2021; 2023) reconheceram seis subfamílias: Entomobryinae, Lepidocyrtinae, Seirinae, Paronellinae, Paronellidinae e Salininae. Nas reconstruções filogenéticas recentes, baseadas em dados moleculares, a subfamília Paronellinae é representada pelos gêneros *Troglopedetes* Joseph, 1872, *Trogolaphysa* Mills, 1938 e *Cyphoderus* Nicolet, 1842. Destes gêneros, apenas *Trogolaphysa* e *Cyphoderus* possuem representantes na região Neotropical e geralmente são representados por um único ou no máximo dois táxons terminais representates para cada gênero, devido a baixa disponibilidade de dados genéticos fidedignos disponibilizados em plataformas públicas (como o NCBI), ou sequenciados para estudos (Bellini *et al.* 2022; Godeiro *et al.* 2022; Nilsai *et al.* 2025).

No campo da taxonomia e sistemática, os avanços nas técnicas moleculares têm resultado em um crescimento na disponibilidade de dados genômicos, impulsionando estudos para elucidação das relações filogenéticas, com foco especial para ordem Entomobryomorpha (Cuccini *et al.* 2020; Godeiro & Zhang 2021; Cipola *et al.* 2025). Por possuir tamanho pequeno, fita simples e ser mais conservados, o conjunto completo do DNA mitocondrial (mitogenoma) está sendo amplamente utilizado como modelo para evolução de grupos de metazoários e, nos últimos anos, vem sendo mais frequentemente utilizado em filogenias de Collembola (Cuccini *et al.* 2020; Godeiro *et al.* 2021; Bellini *et al.* 2022).

O mitogenoma dos metazoários é notavelmente conservado e consiste em uma estrutura circular contendo aproximadamente 15.000 a 20.000 pares de bases (bp), organizadas em 37 genes: 13 genes codificadores de proteínas (CDS), dois genes de RNA ribossômico (rRNA), 22 genes de RNA transportador (tRNA), além de uma região controle não codificante, conhecida como *D-loop* (Boore 1999). Esses genes são responsáveis por codificar proteínas que participam da cadeia de fosforilação oxidativa, um processo importante para a respiração celular (Boore 1999; Shtolz & Mishmar, 2019). A região controle de mitogenoma é rica em bases de adenina (A) e timina (T) e é responsável pela iniciação da transcrição e replicação do genoma mitocondrial em insetos (Boore 1999; Saito *et al.* 2005).

O primeiro mitogenoma completo de Collembola foi sequenciado em 2001, da espécie *Tetrodontophora bielanensis* (Waga, 1842) (Nardi *et al.*, 2001). Diferentemente dos marcadores isolados tradicionalmente empregados em filogenias, a utilização completa dos genes codificadores de proteínas (CDS) permite análises filogenéticas mais robustas, como apresentadas por Godeiro *et al.* (2021; 2022; 2023), Cucini *et al.* (2020) e Bellini *et al.* (2022). Apesar do crescente número de mitogenomas de Collembola depositados no NCBI, a maioria provém de espécimes asiáticos e europeus. Nesse contexto, aprimorar a compreensão das relações filogenética de Paronellinae baseada em táxons da região Neotropical é importante para observar a diversidade mitogenômica e enriquecer a base de dados genômicos. Portanto, este capítulo teve como objetivo principal apresentar o mitogenoma completo de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov., e testar as relações filogenéticas internas de Paronellinae, incorporando o novo mitogenoma sequenciado em análises baseadas em loci conservados.

2 METODOLOGIA

2.1 Extração e construção de bibliotecas de genoma mitocondrial

O DNA de indivíduos de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov., coletados no solo da caverna Furna Feia, localizada no Parque Nacional da Furna Feia (05°02'12.8"S; 37°33'36.6"W), Baraúna, Rio Grande do Norte, foram extraídos a partir de um *pool* com 8 indivíduos com o kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, Madison, WI, USA), seguindo suas próprias instruções. A quantificação do DNA foi realizada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 1000 e um fluorímetro Qubit 2.0.

As bibliotecas de sequenciamento foram construídas utilizando o Illumina DNA Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, EUA), com um tamanho de 500 bp, seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Illumina NextSeq550, utilizando um kit *paired-end High Output* v2 (300 ciclos).

2.2 Montagem e anotação de mitogenomas

Os dados brutos obtidos do sequenciamento de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. com um total de 4.5 Gb cada foram agrupados e reduzidos à 2.5 Gb. Em seguida, foi utilizado o script “quality_control.sh” (disponível em <https://github.com/xtmtd/Phylogenomics/>) com as ferramentas “clumpify.sh” e “bbduk.sh” do BBTools (Bushnell 2018), que foram empregadas na filtragem dos dados ao remover adaptadores e duplicatas, leituras com muitos “N” e regiões de baixa qualidade.

A montagem do genoma de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. foi realizada com o NOVOPlasty (<https://github.com/ndierckx/NOVOPlasty>) e a anotação genética no MitoZ (<https://github.com/linzhi2013/MitoZ>), com o comando “mitoz annotate -h”. As anotações do mitogenoma de cada espécie foram armazenadas em diretório distintos para construção de matrizes mitogenéticas a partir do *pipeline* “matrix_generation_mtDNA.sh”, disponível no repositório: https://github.com/xtmtd/Phylogenomics/tree/main/mitogenome_scripts.

2.3 Extração de loci

Foram extraídas as sequências nucleotídicas dos genes codificadores de proteína (CDS) e rRNA individualmente para cada espécie. Para cada locus, um arquivo *.fasta* foi criado. As sequências de aminoácidos para os CDS foram inferidas a partir das sequências nucleotídicas usando o TransDecoder v.5.7.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>), com modelo para mitogenomas de invertebrados, garantindo a identificação das regiões de fase de leitura aberta (*open reading frame* – ORFs) mais longas. Após a extração, todos os arquivos *.fasta* correspondente ao mesmo locus foram concatenados em um arquivo único para alinhamento.

2.4 Alinhamento de loci e edição (*trimming*)

Os arquivos *.fasta* contendo as sequências nucleotídicas de cada locus foram alinhados individualmente utilizando a ferramenta “-auto” do MAFFT v.7.526 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). O alinhamento das sequências de aminoácidos (genes CDS traduzidos) e rRNA também foi realizado com o MAFFT, mas utilizou a estratégia L-INS-i.

Os alinhamentos brutos foram filtrados com a ferramenta trimAl (<https://github.com/inab/trimal>) para remoção de regiões de baixa qualidade, ou lacunas extensas que poderiam produzir ruído nas análises filogenéticas. A etapa de saturação do pipeline foi ignorada para concatenação de todos os genes CDS e rRNA, pois uma vez limitada a saturação, os genes com alta saturação eram removidos, ocorrendo uma perda considerável de informações genéticas para algumas espécies.

2.5 Construção de matrizes para análise filogenética

Os alinhamentos de todos os loci mitocondriais (nucleotídicos, aminoácidos e rRNA) foram concatenados em uma supermatriz com a ferramenta FAZconCAT-G (<https://github.com/PatrickKueck/FASconCAT-G>). Para a reconstrução filogenética de Paronellinae foi utilizada a matriz de aminoácidos de CDS e matriz nucleotídica de CDS.

As árvores filogenéticas de nucleotídeos e aminoácidos para os 13 genes codificantes de proteínas foi reconstruída no IQTree v2.0.7 (Minh *et al.*, 2020), com um modelo de partição (*edge-linked proportional partition model*). O alinhamento concatenado foi fornecido no formato PHYLIP (“FcC_supermatrix.phy”), e as partições correspondentes aos diferentes genes/regiões foram definidas no arquivo “FcC_supermatrix_partition.txt”.

A seleção do melhor modelo de substituição para cada partição foi conduzida com o ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), utilizando a opção -m MFP, restrita aos modelos adequados para genomas mitocondriais (--msub mitochondrial). Os modelos evolutivos empregados para todos os genes estão descritos na Tabela 1. O suporte dos nós foi avaliado por meio de 1.000 replicações de *bootstrap* ultrarrápido (UFBoot2; Hoang *et al.*, 2018) e 1.000 replicações de teste de razão de verossimilhança aproximado de Shimodaira-Hasegawa (*Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test* - SH-aLRT) (Guindon *et al.*, 2010). As árvores de máxima verossimilhança (ML) resultantes foram obtidas a partir do modelo de melhor ajuste e apresenta os valores de suporte combinados para cada clado.

Tabela 1. Modelo evolutivo para cada gene utilizado na reconstrução das árvores de máxima verossimilhança.

Gene	Modelo evolutivo (Aminoácidos)	Modelo evolutivo (Nucleotídeos)
ATP6	mtART+I+G4	K3Pu+F+I+G4
ND1	mtART+I+G4	K3Pu+F+I+G4
ATP8	mtZOA+F+G4	TIM2+F+I+G4
ND6	mtZOA+F+G4	HKY+F+I+G4
COX1	mtART+I+R3	GTR+F+R3
COX2	mtART+I+R3	GTR+F+I+R4
COX3	mtART+I+R3	GTR+F+R3
CYTB	mtART+I+R3	GTR+F+I+R4
ND2	mtART+F+G4	GTR+F+I+R3
ND3	mtInv+F+I+G4	GTR+F+I+R3
ND4	mtInv+F+I+G4	GTR+F+I+G4
ND4L	mtInv+F+I+G4	TVM+F+R4
ND5	mtInv+F+I+G4	TVM+F+R4

Tabela 2. Lista de espécies utilizadas nas análises de mitogenoma com suas respectivas informações taxonômicas, de depósito e referências. O novo mitogenoma está marcado em negrito.

#	Espécie	Ordem	Família	Subfamília	GenBank	País	Referência
1	<i>Callyntrura guangdongensis</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Salininae	MT906652.1	China	Godeiro <i>et al.</i> 2021
2	<i>Salina celebensis</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Salininae	NC_046522.1	China	Sun <i>et al.</i> 2020
3	<i>Cyphoderus albinus</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	NC_046888.1	França	Sun <i>et al.</i> 2020
4	<i>Troglopedetes dispersus</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	MT914176.1	Tailândia	Godeiro <i>et al.</i> 2021
5	<i>Troglopedetes meridionalis</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	PQ649740.1	Tailândia	Nilsai <i>et al.</i> 2025
6	<i>Trogolaphysa</i> sp. AM47	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	MF716607.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2020
7	<i>Trogolaphysa</i> sp.	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	MT914177.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
8	<i>Trogolaphysa zeppelinii</i> comb. nov.	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellinae	-	Brasil	Este estudo
9	<i>Zhuqinia jingwanae</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellidinae	MT906653.1	Austrália	Godeiro <i>et al.</i> 2021
10	<i>Paronellides praefectus</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Paronellidinae	MT914178.1	China	Godeiro <i>et al.</i> 2021
11	<i>Lepidocyrtus nigrosetosus</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Lepidocyrtinae	MW033192.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
12	<i>Lepidocyrtus sotoi</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Lepidocyrtinae	MT928545.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
13	<i>Pseudosinella tumula</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Lepidocyrtinae	MT611221.1	China	Godeiro <i>et al.</i> 2021
14	<i>Entomobrya</i> sp.	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Entomobryinae	MF716608.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
15	<i>Lepidocyrtoides caeruleomaculatus</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Entomobryinae	MF716618.1	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
16	<i>Lepidosira neotropicalis</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Entomobryinae	MF716603	Brasil	Nunes <i>et al.</i> 2019
17	<i>Tyrannoseira raptora</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Seirinae	MF716610	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
18	<i>Lepidocyrtinus dapeste</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Seirinae	MF716609	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
19	<i>Seira potiguara</i>	Entomobryomorpha	Entomobryidae	Seirinae	MF716613	Brasil	Godeiro <i>et al.</i> 2021
20	<i>Dicranocentrus wangi</i> *	Entomobryomorpha	Orchesellidae	Heteromurinae	NC_046887.1	China	Sun <i>et al.</i> 2020

* Grupo externo da análise.

3 RESULTADOS

O mitogenoma de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. é uma molécula circular de 14.822 pares de base (bp) que apresenta 13 genes codificadores de proteínas (CDS), 22 genes ribossomais transportadores (tRNA) e dois genes ribossômicos (rRNA), totalizando 37 genes que estão descritos na Tabela 3. A região controle não foi encontrada durante a anotação automática do mitogenoma.

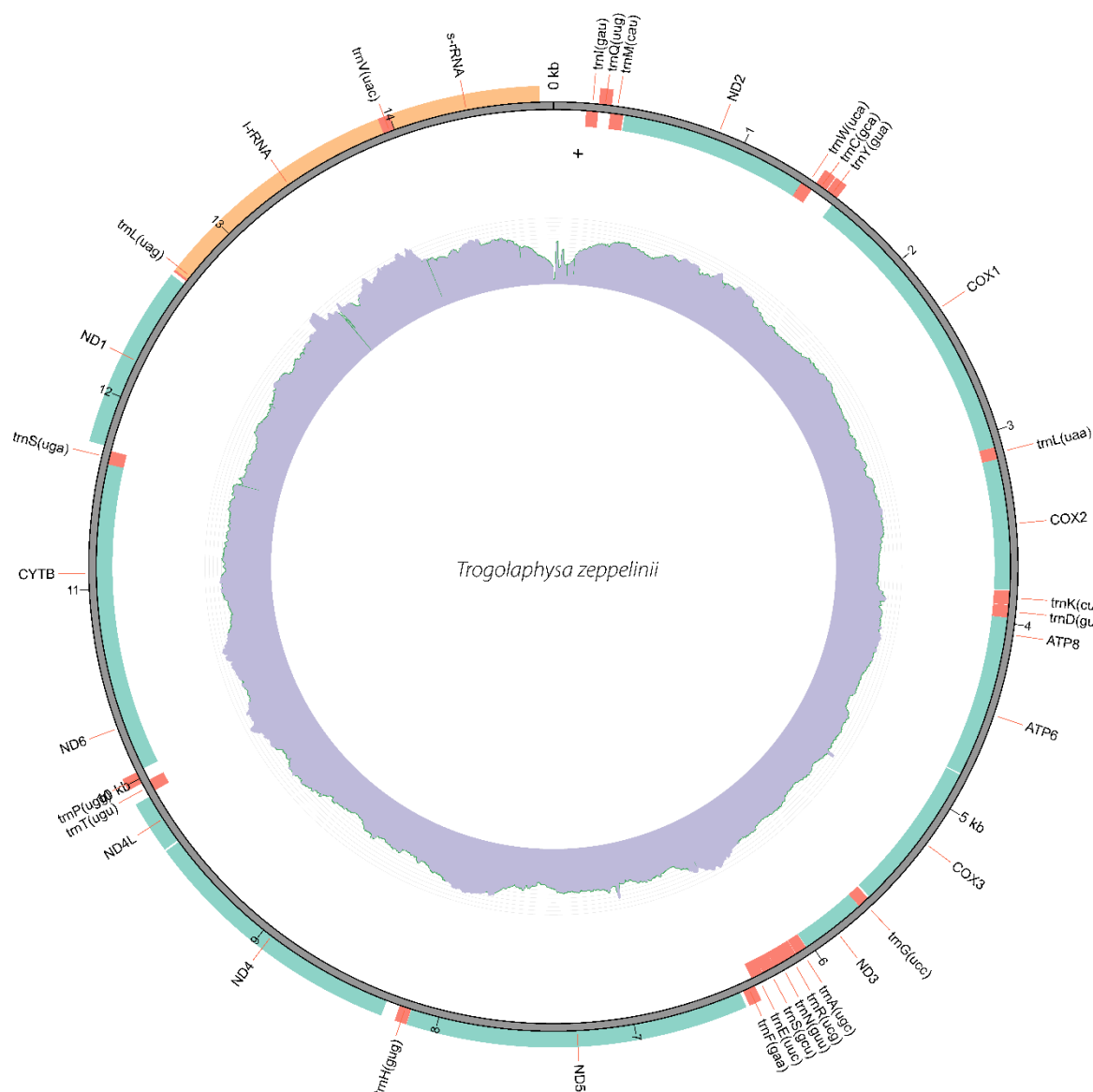


Figura 1. Representação circular do mitogenoma de *Trologaphysa zeppelinii* comb. nov. O círculo interno demonstra a cobertura das *reads* e o círculo mais externo apresenta os genes (em verde), rRNA (laranja) e os tRNA (em vermelho).

Os 13 genes codificadores de proteínas de *T. zeppelinii* comb. nov. estão organizados na seguinte ordem: ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND5, ND4, ND4L, ND6, CYTB e ND1. Desses, quatro genes (ND5, ND4, ND4L e ND1) estão localizados na fita menor, enquanto os nove genes estão na fita maior (Fig. 1; Tab. 3). A ordem dos genes mitocondriais de *T. zeppelinii* comb. nov. é a mesma do modelo Pancrustacea, sem inversões ou deleções de CDS, tRNA ou rRNA (Sun *et al.* 2020; Cuccini *et al.* 2021).

A reconstrução filogenética possui 11 espécies brasileiras (Tabela 2), representando principalmente as subfamílias de Entomobryinae, Seirinae, Lepidocyrtinae e Paronellinae. Os grupos internos da reconstrução filogenética de ML suportam o monofiletismo de Paronellinae, Seirinae, Lepidocyrtinae, Paronellidinae e Salininae, mas não da subfamília Entomobryinae (Fig. 2). A relação entre Salininae e Paronellidinae demonstra um baixo suporte filogenético de *bootstrap* e SH-aLRT (respectivamente, 21.5/55), o mesmo ocorrendo com a relação entre (Seirinae + Lepidocyrtinae) e (Entomobryinae + Paronellidinae + Salininae) (4.5/43).

Tabela 3. Descrição do mitogenoma de *Trologaphysa zeppelinii* comb. nov.

Início	Fim	Tamanho (bp)	Direção	Tipo	Gene	Códons de início/parada
169	232	64	+	tRNA	trnI(gau)	
231	297	67	-	tRNA	trnQ(uug)	
294	363	70	+	tRNA	trnM(cau)	
369	1353	985	+	CDS	ND2	ATG/TAA
1352	1418	67	+	tRNA	trnW(uca)	
1417	1479	63	-	tRNA	trnC(gca)	
1483	1547	65	-	tRNA	trnY(gua)	
1548	3082	1535	+	CDS	COX1	ATA/TAA
3082	3146	65	+	tRNA	trnL(uaa)	
3146	3827	682	+	CDS	COX2	ATT/TAA
3831	3904	74	+	tRNA	trnK(cuu)	
3905	3971	67	+	tRNA	trnD(guc)	
3971	4139	169	+	CDS	ATP8	ATT/TAA
4132	4816	685	+	CDS	ATP6	ATA/TAA
4822	5611	790	+	CDS	COX3	ATG/TAA
5620	5683	64	+	tRNA	trnG(ucc)	
5683	6028	346	+	CDS	ND3	ATA/TAA
6030	6092	63	+	tRNA	trnA(ugc)	
6093	6157	65	+	tRNA	trnR(ucg)	
6155	6221	67	+	tRNA	trnN(guu)	
6221	6289	69	+	tRNA	trnS(gcu)	
6289	6355	67	+	tRNA	trnE(uuc)	
6357	6422	66	-	tRNA	trnF(gaa)	
6438	8145	1708	-	CDS	ND5	ATG/TAG
8146	8207	62	-	tRNA	trnH(gug)	
8277	9624	1348	-	CDS	ND4	ATG/TAA
9633	9897	265	-	CDS	ND4L	ATG/TAG

9911	9974	64	+	tRNA	trnT(ugu)	
9974	10037	64	-	tRNA	trnP(ugg)	
10039	10519	481	+	CDS	ND6	ATA/TAA
10515	11652	1138	+	CDS	CYTB	ATA/TAA
11650	11721	72	+	tRNA	trnS(uga)	
11740	12658	919	-	CDS	ND1	ATG/TAA
12676	12741	66	-	tRNA	trnL(uag)	
12688	14097	1410	-	rRNA	l-rRNA	
13941	14007	67	-	tRNA	trnV(uac)	
14001	14755	755	-	rRNA	s-rRNA	

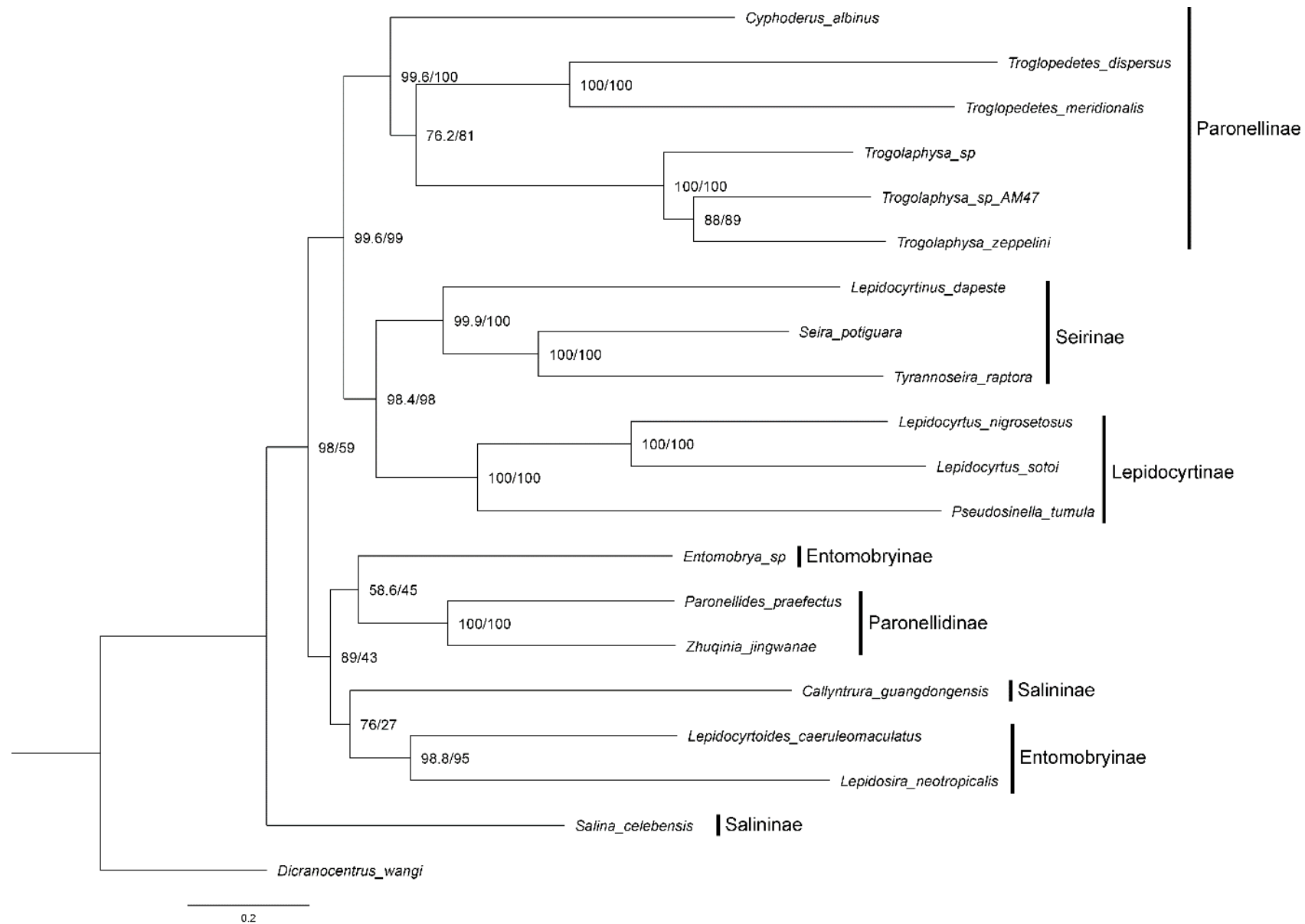


Figura 2. Posicionamento filogenético de *Trogolaphysa zeppelinii* comb. nov. dentro de Paronellinae em uma filogenia de Entomobryidae. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap* ultrarrápido e o suporte SH-aLRT, respectivamente, para a análise de ML baseada em nucleotídeos.

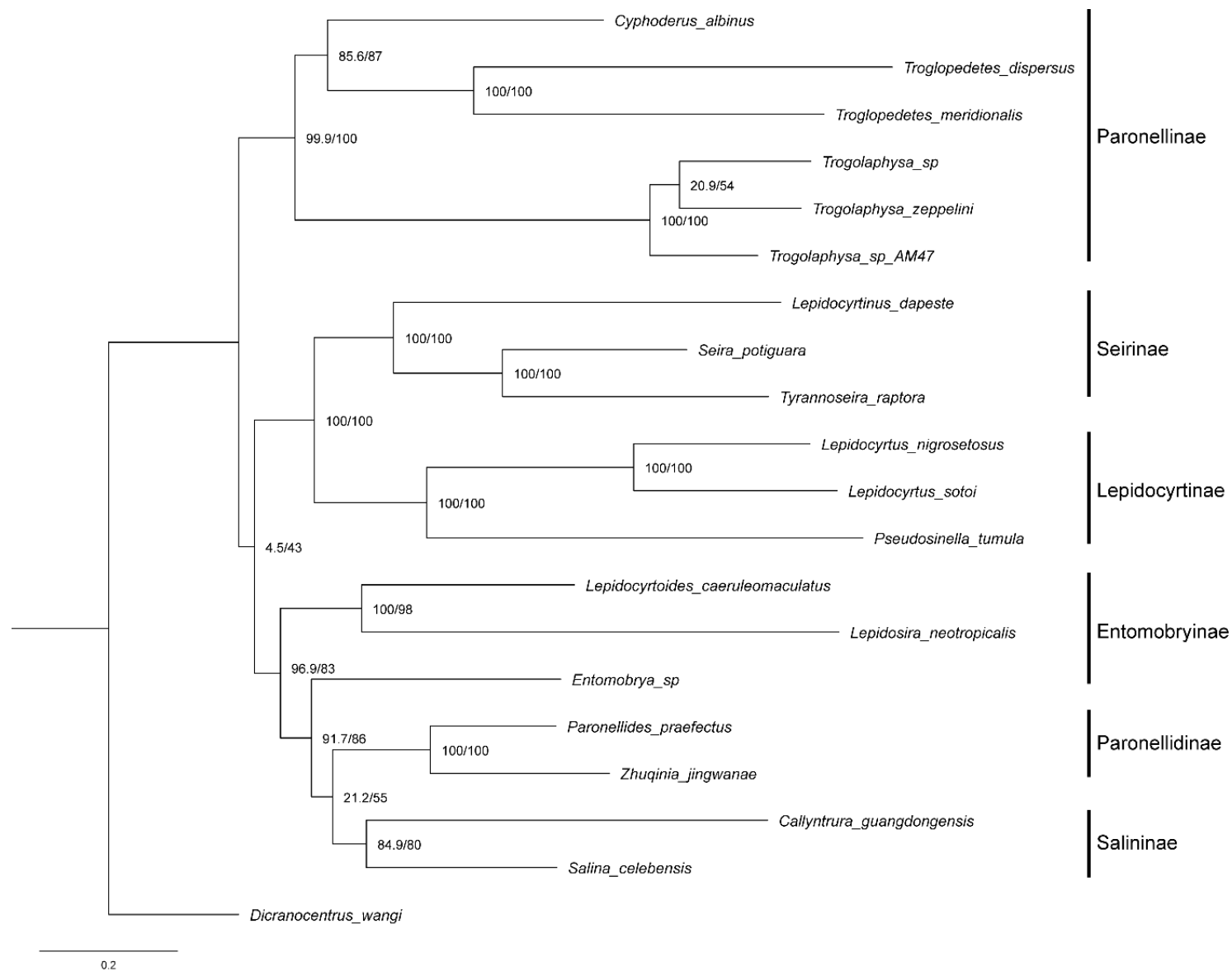


Figura 3. Posicionamento filogenético de *Trogolaphysa zeppelini* comb. nov. dentro de Paronellinae em uma filogenia de Entomobryidae. Os números dos nós representam os valores de bootstrap e o suporte SH-aLRT, respectivamente, para a análise de ML baseada em aminoácidos.

4 DISCUSSÃO

O gênero *Trogolaphysa* possui ampla distribuição no território brasileiro e na região Neotropical, com espécies conhecidas tanto por características epígeas quanto hipógeas (Souza *et al.* 2021; Zeppelini *et al.* 2022; Soto-Adames *et al.* 2024). Os três mitogenomas representantes deste gênero na filogenia são de espécies epígeas de diferentes regiões do Brasil (*Trogolaphysa* sp. AM47 da Bahia, *Trogolaphysa* sp. do Piauí e *Trogolaphysa zeppelini* comb. nov. do Rio Grande do Norte). Contudo, *T. zeppelini* também é encontrada em ambientes cavernícolas. Essa afinidade por cavernas é compartilhada com outras linhagens de Paronellinae, como representantes dos gêneros *Cyphoderus* e *Troglopedetes*.

Na maioria das filogenias de Entomobryoidea mais recentes, Paronellinae se apresenta como monofilética e próxima a Seirinae e Lepidocyrtinae (Bellini *et al.* 2022; Godeiro *et al.* 2022; Godeiro *et al.* 2025). A inclusão de *Trogolaphysa zeppelini* comb. nov. na análise recupera apenas a monofilia das subfamílias de Lepidocyrtinae, Seirinae e Paronellinae, e apresenta topologia interna semelhante à àvore de Godeiro *et al.* (2021).

Apesar da proximidade entre os gêneros *Cyphoderus*, *Trogolaphysa* e *Troglopedetes* ser corroborada na maioria das análises filogenéticas mais recentes, as topologias das árvores apresentam resultados ligeiramente diferentes, com *Cyphoderus* na base do clado dos Paronellinae (Bellini *et al.* 2022), como grupo irmão de *Trogolaphysa* (Nilsai *et al.* 2025) ou como grupo irmão de *Troglopedetes* (Godeiro *et al.* 2021). Nesta análise, com maior representatividade de Paronellinae, o gênero *Cyphoderus* se estabelece na base dos Paronellinae (Fig. 2) ou como grupo irmão de *Troglopedetes* (Fig. 3). Portanto, para estabelecer melhor as relações internas dos Paronellinae, é necessária a inclusão de mais mitogenomas de *Cyphoderus*, assim como de outros gêneros representantes de Paronellinae.

Apesar das filogenias não resgatarem a monofilia de Entomobryinae, a relação entre Lepidocyrtinae, Seirinae e Paronellinae está presente na filogenia de nucleotídeos. Esta proximidade entre as subfamílias mencionadas é corroborada por filogenias recentes tanto por análises de ML quanto Bayesianas (Bellini *et al.* 2022; Godeiro *et al.* 2023; Nilsai *et al.* 2025). Os representantes de Lepidocyrtinae e Paronellinae apresentam habitus e morfologia semelhantes, com oligoquetotaxia na cabeça e tronco e mesmo padrão de sensilas do Th. II ao Abd. III (formula: 1, 1 | 0, 1, 1), sendo estas características provavelmente plesiomórficas no ramo Paronellinae + (Lepidocyrtinae + Seirinae) (Zhang *et al.* 2015; Bellini *et al.* 2022). De fato, os Seirinae apresentam morfologia mais complexa do ponto de vista da quetotaxia dorsal, com plurimacroquetose (desenvolvimento de múltiplos secundários durante a

ontogênese de macroquetas observadas no primeiro instar). Este padrão de macroquetotaxia na subfamília provavelmente se desenvolveu posteriormente entre os Entomobryidae derivados (Bellini *et al.* 2022).

5 CONCLUSÃO

A inclusão dos novos mitogenomas na análise de Paronellinae, em particular da espécie neotropical *T. zeppelinii* comb. nov., foi fundamental para incorporar diversidade genética regional às análises que frequentemente se restringem a espécies europeias e asiáticas. Gêneros com ampla distribuição podem exibir características morfológicas distintas entre regiões, como demonstrado por Cipola *et al.* (2018), ao evidenciar diferenças na macroquetotaxia em espécies de *Seira* da região Paleártica e Oriental, comparadas a outras localidades. Consequentemente, a sub-representação de linhagens de diferentes regiões geográficas em estudos filogenéticos pode resultar em baixa resolução filogenética ou topologias artificiais e pouco informativas, ressaltando a necessidade de uma amostragem taxonômica e geográfica mais abrangente.

REFERÊNCIAS

- Bellini, B. C., Zhang, F., de Souza, P. G. C., dos Santos-Costa, R. C., Medeiros, G. D. S., & Godeiro, N. N. (2022). The evolution of Collembola higher taxa (Arthropoda, Hexapoda) based on mitogenome data. *Diversity*, 15(1), 7. <https://doi.org/10.3390/d15010007>
- Boore, J. L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8), 1767–1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
- Bushnell, B. (2018). BBTools: a suite of fast, multithreaded bioinformatics tools designed for analysis of DNA and RNA sequence data. *Joint Genome Institute*.
- Cipola, N. G., Arbea, J., Baquero, E., Jordana, R., Morais, J. W., & Bellini, B. C. (2018). The survey *Seira* Lubbock, 1870 (Collembola, Entomobryidae, Seirinae) from Iberian Peninsula and Canary Islands, including three new species. *Zootaxa*, 4458(1), 1-66.
- Cipola, N. G., Katz, A. D., Bu, Y., & Godeiro, N. N. (2025). Systematics of *Willowsia jacobsoni* (Börner, 1913)(Collembola, Entomobryidae): morphology, postembryonic development, distribution, mitogenome and phylogeny. *Zootaxa*, 5604(3), 201-233.
- Cucini, C., Fanciulli, P. P., Frati, F., Convey, P., Nardi, F., & Carapelli, A. (2020). Re-evaluating the internal phylogenetic relationships of Collembola by means of mitogenome data. *Genes*, 12(1), 44.
- Godeiro, N. N., & Zhang, F. (2021). First record of *Seira dowlingi* (Wray, 1953)(Collembola, Entomobryidae, Seirinae) from China and mitogenome comparison with the New World specimens. *Zootaxa*, 5020(1), 191-196.
- Godeiro, N. N., Bellini, B. C., Ding, N., Xu, C., Ding, Y., & Zhang, F. (2021). A mitogenomic phylogeny of the Entomobryoidea (Collembola): A comparative perspective. *Zoologica scripta*, 50(5), 658-666.


- Godeiro, N. N., Ding, Y., Cipola, N. G., Jantarit, S., Bellini, B. C., & Zhang, F. (2022). Phylogenomics and systematics of Entomobryoidea (Collembola): marker design, phylogeny and classification. *Cladistics*, 39(2), 101-115. <https://doi.org/10.1111/cla.12521>
- Joseph, G. (1872) Beobachtungen über die Lebensweise und Vorkommen den in den Krainer Gebirgsgrotten einheimischen Arten der blinden Gattungen *Machaerites*, *Leptodirus*, *Oryotus* und *Troglorrhynchus*. *Jahres-Bericht der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländische Cultur* 49, 171–182.
- Mills, H.B. (1938) *Collembola from Yucatan Caves*. In: Fauna of the caves of Yucatan. Carnegie Institution of Washington Publication, pp. 183–190.
- Nicolet, H. (1842) Recherches pour servir á l'Histoire des Podurelles. *Nouvelles Mémoires de la Société Helvetica Scientiae Naturalis*, 6, 1–88.
- Nilsai, A., Jantarit, S., Detcharoen, M. & Godeiro, N. N. (2025). Complete mitogenome and the phylogenetic status of *Troglopedetes meridionalis* Jantarit, Surakhamhaeng & Deharveng, 2020 (Collembola, Entomobryidae). *Zootaxa*, 5646(3), 409-420. DOI: 10.11646/zootaxa.5646.3.5
- Saito, S., Tamura, K., & Aotsuka, T. (2005). Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4), 1695-1705. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.046243>
- Shtolz, N. & Mishmar, D. (2019) The Mitochondrial Genome – on Selective Constraints and Signatures at the Organism, Cell, and Single Mitochondrion Levels. *Frontiers Ecology and Evolution*, 7, 342. doi: 10.3389/fevo.2019.00342
- Soto-Adames, F., Daly, K. M., & Wynne, J. J. (2024). Synopsis of Neotropical Troglaphysa Mills, 1938 (Collembola: Paronellidae) with Reduced Eye Number, and Description of Two New Troglobiontic Species from Belize. *Taxonomy*, 4(1), 199-236.
- Souza, Paolla Gabryelle Cavalcante de. Revisão de *Trogolaphysa* Mills, (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), com a descrição de novas espécies de cavernas, domínio caatinga, Brasil. 2021. 131f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.
- Sun, X., Yu, D., Xie, Z., Dong, J., Ding, Y., Yao, H., & Greenslade, P. (2020). Phylomitogenomic analyses on collembolan higher taxa with enhanced taxon sampling and discussion on method selection. *PLoS One*, 15(4), e0230827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230827>
- Waga, A. (1842) Description d'un insecte aptère qui se trouve en quantité aux environs de Varsovie. *Annales de la Société Entomologique de France* 11, 264—272.
- Zhang, F. & Deharveng, L. (2015) Systematic revision of Entomobryidae (Collembola) by integrating molecular and new morphological evidence. *Zoologica Scripta*, 44 (3), 298–311. <https://doi.org/10.1111/zsc.12100>

Capítulo 3 – Novas espécies de *Cyphoderus* Nicolet e *Pararrhopalites* Bonet & Tellez (Hexapoda, Collembola) do bioma Caatinga, Brasil

New cave species of Cyphoderus Nicolet and Pararrhopalites Bonet & Tellez (Hexapoda, Collembola) from Caatinga biome, Brazil.

Publicado no periódico *Zootaxa* 5474(3): 201-224 em colaboração com Gleyce da Silva Medeiros, Diego de Medeiros Bento, Douglas Zeppelini e Bruno Cavalcante Bellini.
DOI: [10.11646/zootaxa.5474.3.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.5474.3.1)

Capítulo formatado conforme normas da *Zootaxa*.

 <i>Zootaxa</i> 5474 (3): 201–224 https://www.mapress.com/zt/ Copyright © 2024 Magnolia Press	<h2>Article</h2>	ISSN 1175-5326 (print edition) ZOOTAXA ISSN 1175-5334 (online edition)
https://doi.org/10.11646/zootaxa.5474.3.1 http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:8195C49D-7E8A-4363-9F43-0268144AA946		
New cave species of <i>Cyphoderus</i> Nicolet and <i>Pararrhopalites</i> Bonet & Tellez (Hexapoda, Collembola) from Caatinga biome, Brazil		
PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA^{1,2,5*}, GLEYCE DA SILVA MEDEIROS^{2,6}, DIEGO DE MEDEIROS BENTO³, DOUGLAS ZEPPELINI^{1,4} & BRUNO CAVALCANTE BELLINI^{2,7*}		
¹ <i>Graduate Program of Biological Science (Zoology). Centre of Exact Sciences and Nature (CCEN), Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil</i>		
² <i>Department of Botany and Zoology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Brazil</i>		
³ <i>Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV), Base Avançada em Natal, 59015-350, Tirol, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil (DMB)</i>		
⁴ diego.bento@icmbio.gov.br ; https://orcid.org/0000-0002-3773-8290		
⁵ <i>Laboratory of Systematics of Collembola and Conservation, Institute of Soil Biology—State University of Paraíba, Brazil.</i>		
⁶ zeppelini1969@yahoo.com.br ; https://orcid.org/0000-0002-9026-1129		
⁷ paollasouzac@gmail.com ; https://orcid.org/0000-0003-0612-8438		
⁶ gleycemedeiros96@gmail.com ; https://orcid.org/0000-0001-9839-2345		
⁷ entobellini@gmail.com ; https://orcid.org/0000-0001-7881-9436		
[*] <i>Corresponding authors</i>		

New cave species of *Cyphoderus* Nicolet and *Pararrhopalites* Bonet & Tellez (Hexapoda, Collembola) from Caatinga biome, Brazil

PAOLLA GABRYELLE CAVALCANTE DE SOUZA^{1,2*}, GLEYCE DA SILVA MEDEIROS², DIEGO DE MEDEIROS BENTO³, DOUGLAS ZEPPELINI^{1,4} & BRUNO CAVALCANTE BELLINI^{2*}

¹Graduate Program of Biological Science (Zoology). Centre of Exact Sciences and Nature (CCEN), Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

mailto: paollasouzac@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0612-8438>

²Department of Botany and Zoology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Brazil

mailto: gleycemedeiros96@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9839-2345>

mailto: entobellini@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7881-9436>

³ Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV), Base Avançada em Natal, 59015-350, Tirol, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil (DMB)

mailto: diego.bento@icmbio.gov.br; <https://orcid.org/0000-0002-3773-8290>

⁴Laboratory of Systematics of Collembola and Conservation, Institute of Soil Biology – State University of Paraíba, Brazil.

mailto: zeppelini1969@yahoo.com.br; <https://orcid.org/0000-0002-9026-1129>

*Corresponding authors: paollasouzac@gmail.com; entobellini@gmail.com

Abstract

In recent years, surveys have revealed a high diversity of troglophilic and troglobitic species of Brazilian Collembola, mainly represented by the Entomobryidae and Sminthuridae, which hold some representative genera in Brazilian caves such as *Cyphoderus* Nicolet and *Pararrhopalites* Bonet & Tellez. Here we describe in detail two new species of these genera sampled from caves of the semiarid region of Rio Grande do Norte state, Brazil. *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** is similar to other Neotropical species of the *tridenticulati* group, but it is unique by the combination of labial chaetotaxy, unguis with a filamentous apical tooth and number of feathered chaetae on the dorsal face of the dens. *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.** differs from other Neotropical species of the genus especially by the number of subsegments of the fourth antennomere, number of cephalic spines, manubrium chaetotaxy and ventral dens formula. Recognition of these species enhances our understanding of the subterranean fauna in the Neotropics, and their identification may support future conservation policies for caves of the Rio Grande do Norte state, Brazil.

Keywords: chaetotaxy, Entomobryidae, Sminthuridae, soil fauna, taxonomy

Introduction

The understanding of the taxonomic richness of cave springtails has significantly advanced in recent years in Brazil, with the description of numerous troglomorphic taxa (Cipola *et al.* 2020; Zeppelini *et al.* 2020, 2022; Souza *et al.* 2022; Oliveira *et al.* 2023). Most of the known Collembola species found exclusively in caves and mesovoid shallow substratum have adaptations for living underground, such as reduced pigmentation and eyes, elongated appendages and changes in mucronal and foot morphology (Christiansen 1961, 1988; Cipola

et al. 2020; Zeppelini *et al.* 2022; Souza *et al.* 2022). In Brazil, the majority of the cave Collembola species belong to Entomobryidae and Sminthuridae (Zeppelini *et al.* 2022).

The subfamily Paronellinae (Entomobryomorpha, Entomobryidae *sensu* Godeiro *et al.* 2023) currently has 18 genera distributed worldwide, with at least three genera found in Brazilian caves: *Cyphoderus* Nicolet, 1842, *Trogolaphysa* Mills, 1938 and *Troglobius* Palacios-Vargas & Wilson, 1990 (Zeppelini *et al.* 2022; Bellinger *et al.* 1996–2024). *Cyphoderus* is the largest genus in the subfamily, comprising more than 80 valid species to date (Oliveira *et al.* 2023; Bellinger *et al.* 1996–2024). Historically, *Cyphoderus* taxonomy has been mostly based on the morphology of the foot complex and mucro, as well as dental chaetotaxy; the dorsal chaetotaxy within the genus is rather stable, showing little interspecific differences (Delamare-Deboutteville 1948; Thibaud & Najt 1987; Oliveira *et al.* 2023). For instance, Delamare-Deboutteville (1948) established five groups of species based on the number and disposition of the mucronal teeth of *Cyphoderus* taxa. This classification divided the species into five groups: *inermes*, *bidenticulati*, *tridenticulati*, *quadridenticulati* and *multidentati* (Delamare-Deboutteville 1948; Oliveira *et al.* 2023). In the Neotropical region there are currently six known species of the *tridenticulati* group, with two of them found in Brazil, *C. arlei* Cassagnau, 1963 and *C. mucrominimus* Oliveira, Alves & Zeppelini, 2017 (Oliveira *et al.* 2023; Zeppelini *et al.* 2024a).

The taxonomic richness of cave Sminthuridae (Symphypleona) in Brazil is represented by two genera of Sminthurinae: *Pararrhopalites* Bonet & Tellez, 1947 and *Troglobentosminthurus* Bellini, Medeiros & Souza, 2022 (*in* Souza *et al.* 2022). After *Sminthurus* Latreille, 1802 with 74 valid species, and *Temeritas* Richards, 1963 *in* Delamare-Deboutteville & Massoud (1963) with 41, *Pararrhopalites* is the third largest genus of Sminthurinae, with 17 nominal species mostly known from tropical and subtropical regions (Bellinger *et al.* 1996–2024). Almost all *Pararrhopalites* species found in Brazil were sampled within caves (5 spp.), and show some degree of adaptation to live in the subterranean environment (Zeppelini & Brito 2014; Zeppelini *et al.* 2024b). The number of subsegments of the fourth antennomere, eyes and cephalic spines, together with chaetotaxy of the anal valve, tenaculum and dens venter are the most important traits used to diagnose *Pararrhopalites* species (Zeppelini & Brito 2014).

Recent surveys in the karstic region of Rio Grande do Norte state, northeastern Brazil, have shown a hexapod diversity mainly composed of troglaphiles and troglobites (Castro-Souza *et al.* 2017; Merlo *et al.* 2022). The species described here belong to this karst and are the first nominal taxa of *Cyphoderus* and *Pararrhopalites* recorded from caves of the semiarid region of Brazil. Our study is part of an initiative to comprehensively investigate the invertebrate fauna within the caves of Rio Grande do Norte state and to assess potential strategies for their conservation.

Materials and methods

Springtail specimens were sampled with entomological aspirators and paint brushes soaked in alcohol during July 21–26, 2019 and August 15–23, 2023, from caves of the karst of Rio Grande do Norte state, Brazil, from the municipalities of Baraúna and Felipe Guerra (Fig. 1). All sampled caves occur within the Caatinga biome, which is a semiarid domain only seen in Brazil, known by its hot and dry climate, with scarce and poorly distributed rainfall during the year (Kottek *et al.* 2006). These caves are inserted in the limestones of the Jandaíra Formation, deposited during the Upper Cretaceous and corresponding to a carbonate ramp that emerges along the exposed portion of the Potiguar Basin, occupying an area of more than 13,000 km² in the north of the state of Rio Grande do Norte and northeast of the state of Ceará (Bezerra *et al.* 2007). The western region of this Formation has more than 1000 known caves

(CANIE/CECAV 2022), and is of a great biospeleological importance due to a large diversity of troglobitic invertebrates (Bento *et al.* 2021).

The biological material was preserved in ethanol 100%. Some specimens were cleared in Nesbitt's liquid for taxonomic identification, washed in Arlé's liquid, and mounted on semi-permanent slides on Hoyer's medium (Bellinger *et al.* 1996–2024). Specimens of *Pararrhopalites* had their heads removed before they were assembled in glass slides to better visualize the frontal chaetotaxy and other structures. Final slides were dried for about 14 days in a drying oven at 50 °C. For making the drawings, a *camera lucida* tube attached to a Leica DM750 microscope was used, and posteriorly the raw drawings were covered and improved on Adobe Illustrator v. 24.1.1 software. The images of specific structures were taken under a Leica DM750 microscope, using the same software. The type material of the new species is deposited at the Collembola Collection of the Biosciences Center of the Federal University of Rio Grande do Norte (CC/UFRN), Brazil and Soil Fauna Reference Collection of the State University of Paraíba, Brazil (CRFS/UEPB).

The species distribution map (Fig. 1) was made in QGIS software v.3.30.2 with shapefiles from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2024) and cavities data from National Speleological Information Register (CANIE/CECAV, 2024).

The terminology used in the description of the new *Cyphoderus* species follows mainly Gisin (1967) for the basal labial chaetotaxy, Fjellberg (1999) for labial palp structures, Chen & Christiansen (1993) with modifications of Cipola *et al.* (2018) for the post-labial chaetotaxy, Nunes & Bellini (2018) for the dorsal head chaetotaxy, Szeptycki (1979) with additions by Zhang *et al.* (2019) for the dorsal trunk chaetotaxy, and Delamare-Deboutteville (1948) for the mucronal teeth formula. For the new *Pararrhopalites* species, Fjellberg (1999) was used for labial palp structures, Betsch & Waller (1994) for the cephalic and large abdomen chaetotaxy with an adaptation of Vargovitsh's system (2009, 2012, 2013) for posterior chaetotaxy of the large abdomen, and Betsch (1997) for the small abdomen chaetotaxy.

The abbreviations used in the description and drawings are: Ant.—antennal segment(s); Th.—thoracic segment(s); Abd.—abdominal segment(s). The main chaetotaxic symbols used on the species plates are provided in Fig. 2. Chaetae labels and labial papillae are marked in bold in the text.

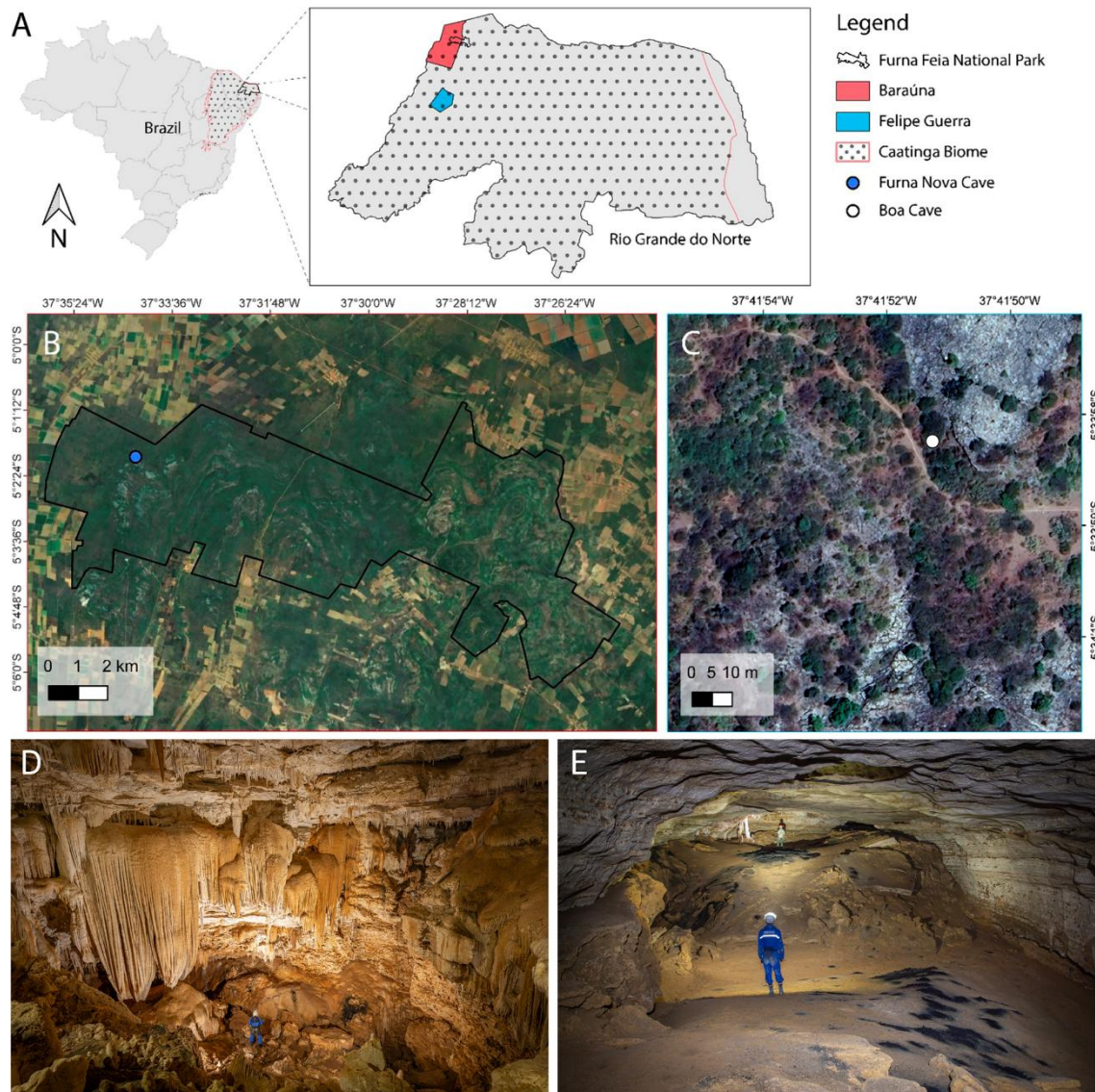


FIGURE 1. Distribution of the sampled caves: **A**, Map of Brazil marking Rio Grande do Norte state and the sampled municipalities; **B**, Baraúna municipality, the blue circle marks the location of Furna Nova Cave inside Furna Feia National Park (delimited by the black line), the type locality of *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.**; **C**, Felipe Guerra municipality, the white circle marks the location of Boa Cave within a semi-arid forest, the type locality of *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** **D**, Furna Nova cave first hall near to the entrance, the specimens of *P. iataganii* **sp. nov.** were found in the dark zone of this cave, which was much darker than it appears in the image; **E**, Boa cave, the image displays piles of guano near to the speleologists, depicting one of the regions of the cave sections, where the specimens of *C. caatinguensis* **sp. nov.** were collected.

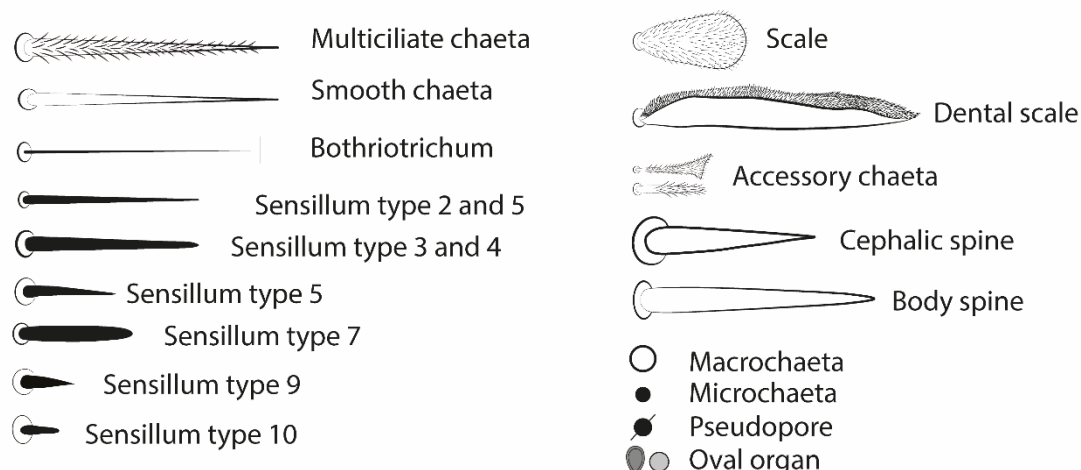


FIGURE 2. Main symbols of the morphological structures used in the descriptions of *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** and *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.**

Taxonomy

Order Entomobryomorpha Börner, 1913

Superfamily Entomobryoidea Womersley, 1934

Family Entomobryidae Tömösvary, 1882 *sensu* Godeiro *et al.* 2023

Subfamily Paronellinae Börner, 1906 *sensu* Godeiro *et al.* 2023

Tribe Cyphoderini Börner, 1913 *sensu* Godeiro *et al.* 2023

Genus *Cyphoderus* Nicolet, 1842

Diagnosis. Specimens pale white or yellowish, never with dark pigments. Scales present, covering at least the dorsal head and trunk. Antennae shorter than the body length, antennomeres undivided. Eyes completely absent. Dorsal head and trunk oligochaetotaxic, with few macrochaetae and secondary chaetae other than the scales. Trunk sensilla as 1,1/0,1,1,+,3 and microsensilla as 0,0/1,0,1,0,0 from Th. II to Abd. V. Abd. IV with 3+3 bothriotricha; unguiculi large, with a strong outer tooth in the postero-external lamella, tenent hairs capitate or acuminate. Collophore posterior region with few ciliate or smooth chaetae plus spines. Dens smooth and straight, without crenulations, with feathered dorsal chaetae and several ciliate chaetae. Mucro variably elongate without a basal spine, with a variable set of teeth (adapted from Szeptycki 1979; Zhang *et al.* 2019; Oliveira *et al.* 2023).

Cyphoderus caatinguensis **sp. nov.** Souza, Bellini & Zeppelini

Figs 1, 3–7, Table 1

Type material. Holotype male in slide: Brazil, Rio Grande do Norte State, Felipe Guerra, Caverna Boa (05°33'59.5"S; 37°41'52.4"W), Aphotic zone, 21/VII/2022, Souza, P.G.C, Santos, N. M. C., Lima, E. C. A., Bento, D. M., Freitas, J. I. M. coll. (CC/UFRN). Paratypes: 1 female in slide, same data of holotype (CC/UFRN); 5 females and 1 juvenile in slide, same data of holotype except 23/VII/2019, Souza, P.G.C, Bellini, B. C., Santos, N. M. C., Bento, D. M., Freitas, J. I. M. coll. (CC/UFRN); and 2 females in slides, same data of holotype

except 23/VII/2019, Souza, P.G.C, Bellini, B. C., Santos, N. M. C., Bento, D. M., Freitas, J. I. M. coll. (CRFS/UEPB).

Diagnosis. Mandibles normal, not modified. Labial papilla **E** lateral process finger-shaped, surpassing the apex of the papilla. Labial basal chaetae formula as: **m**, **e**, **11–2**, **a1–5**, **12** reduced to a minute smooth chaeta, **r** chaeta absent. Dorsal head with five antennal macrochaetae (**f1–5**), **A0** macrochaeta present, **Pa5** as mesochaeta, other chaetae as microchaetae. Abd. IV with one internal and one external macrochaetae (**B4** and **E3**, respectively). Trochanteral organ with 16–19 spine-like smooth chaetae. Ungues with 4 inner teeth, basal pair asymmetrical (basal posterior tooth much larger than basal anterior one), unpaired apical tooth long and filamentous, tenent hairs capitate. Collophore posterior side with 3 ciliate chaetae (1 unpaired), 2 smooth small spines and 1–3 long, smooth distal chaetae. Dens dorsally with 8–10 inner and 8 outer feathered chaetae. Mucro short and with 4 teeth, belonging to *tridenticulati* group, with teeth formula as: *aAi*.

Description. Body length (head + trunk) of specimens 1.2–2.16 mm (n = 5), holotype 1.87 mm, male with 1.87 mm, females with 1.2–2.16 mm (n = 4). Habitus typical of the genus, specimens totally unpigmented. Scales covering Ant. I–II, ventral and dorsal head, dorsal trunk, lateral and ventral manubrium and dens. Legs and collophore without scales.

Antennae shorter than the body length. Antennae segments ratio I: II: III: IV of the holotype as 1: 2.36: 1.81: 3.91. Ant. IV without apical bulb, with ciliate chaetae and at least three types of sensilla (types ‘2’ and ‘3’, elongated sensillum; type ‘4’, finger-shaped sensillum; type ‘10’, minute sensillum with rounded apex, *sensu* Jantarit *et al.* 2014). Ant. III with 2 sensory rods (type ‘7’ *sensu* Jantarit *et al.* 2014) and 2 guard sensilla (type ‘5’ *sensu* Jantarit *et al.* 2014). Ant. II with dorsal scales and at least 4 types of sensilla (types ‘2’, ‘3’, ‘4’ and ‘9’). Ant. I with dorsal scales, multiciliate chaetae and 3 smooth chaetae (Fig. 3A). Prelabral chaetae smooth, labral chaetotaxy with 4 (**a1–2**), 5 (**m0–2**, **m2** shorter than **m1**) and 5 (**p0–2**) smooth chaetae, labral papillae absent (Fig. 3B). Clypeal formula with 4 (**11–2**), 2 (**ft**) and 3 (**pf0–1**) smooth chaetae, **pf0** slightly longer than **pf1** (Fig. 3B). Mandibles regular, without modifications, asymmetrical, with 5+4 teeth (Fig. 3C). Maxillae capitulum globular, without any clear modifications. Labial palp with 6 papillae, formula of the guards as: **H**(2), **A**(0), **B**(5), **C**(0), **D**(4), **E**(4) + a lateral process finger-shaped and surpassing the apex of papilla **E** (Fig. 4D). Outer lobe of maxilla with the basal chaeta longer than the apical one, both smooth, sublobal plate with one chaeta-like appendage, oral fold with 2 smooth chaetae (Fig. 3E). Labial basolateral and basomedian fields with chaetae **m**, **e**, **11–2** and **a1–5** all smooth, **12** reduced to a minute chaeta, **r** chaeta absent, 5 labial proximal chaetae (**lpc**), all smooth (Fig. 3F). Ventral postlabial formula of the anterior chaetae as: 4 (**G1–4**), 2 (**X**, **X4**), 4 (**H1–4**), and 2 (**J1–2**) chaetae, chaeta **X** strongly reduced and smooth, posterior region with 2–3 basal chaetae (Fig. 3F). Dorsal head chaetotaxy with 5 antennal macrochaetae (**f1–5**), 1 anterior macrochaeta (**A0**) and 4 microchaetae (**A1–3**, **A5**), 4 medial microchaetae (**M1–4**), 6 sutural microchaetae (**S0**, **S2–5**), 2 post-sutural microchaetae (**Ps2**, **Ps5**), 4 postero-anterior chaetae (**Pa2–3** as microchaetae, **Pa5** as mesochaeta, **Pa** as the post-ocular bothriotrichum), plus 1 microchaeta of uncertain homology, 2 postero-medial microchaetae (**Pm1–Pm3**), 6 post-occipital posterior microchaetae (**Pp1?**, **Pp3–7**) and 1 postero-external (**Pe3**) microchaeta (Fig. 3G).

Central macrochaetae formula from Th. II to Abd. IV as: 0,0|0,1,0,1, sensilla formula (Th. II–Abd. V) as: 1,1|0,1,1,+,3, microsensilla formula as: 1,0|1,0,1,0,0. Th. II without macrochaetae other than those in the anterior collar, with 3–4 anterior (**a2**, **a3?**, **a5** plus one microchaeta of uncertain homology), 6 medial (**m1–2**, **m4–m6e?**), 6–7 posterior (**p1–p6e**) microchaetae (Fig. 4A). Th. III with 3 anterior (**a2**, **a6–a7**), 4 medial (**m6–m6p**, **m7–m7e**) and 4 posterior (**p2–4**, **p6**) chaetae (Fig. 4B). Abd. I with 1 **ms** and 5 medial (**m2–m6**) microchaetae (Fig. 4C). Abd. II with 5 anterior (**a2i**, **a2**, **a5–7**), 6 medial (**m2–3**, **m3e**, **m3ep**,

m6–7) and 2 posterior (**p5**, **p7**) chaetae, **m2** and **a5** as bothriotricha, **a2i**, **a2**, and **m3e** as their accessory chaetae (Fig. 4D). Abd. III with 5 anterior (**a2i**, **a2**, **a5–7**), 9 medial (**m2–3**, **m3e**, **m3e2**, **m5**, **am6**, **pm6**, **m7i–m7**) and 3 posterior chaetae (**p6–7** plus one microchaeta without clear homology), **a5**, **m2**, and **m5** as bothriotricha, **a2**, **m3e**, **m3e2** and 2–4 extra ones as their accessory chaetae (Fig. 4E). Abd. IV with chaetae formula as: 4 ‘A’ (**A3–A6**), 4 ‘B’ (**B3–B6**, **B4** as macrochaetae), 4–5 ‘C’ (**C1–4**), 7 ‘T’ (**T1–7**), 3 ‘D’ (**D1–3**), 4 ‘E’ (**E1–4**, **E3** as macrochaetae), 3 ‘F’ (**F1–3**) and 3 ‘Fe’ (**Fe2–4**); 1 posterior (**ps**) and at least 2 internal sensilla, posterior region with 5 transversal mesochaetae and 3–4 pseudopores (Fig. 5A). Abd. V with 5 anterior (**a1**, **a3**, **a5–6e**), 3 medial (**m2–3**, **m5**) and 4 posterior (**p1**, **p3–5**) main mesochaetae (Fig. 5B).

Trochanteral organ with 16–19 smooth spine-like chaetae (Figs 6A–B), femur III with several smooth spine-like chaetae similar to those of the trochanteral organ (Fig. 6B). Tibiotarsi I–III with an internal row of finely ciliate, abruptly pointed macrochaetae (Fig. 6C). Ungues with 4 inner teeth, 2 paired basal asymmetrical (basal posterior tooth remarkably larger than basal anterior tooth), 1 unpaired median and 1 unpaired apical tooth longer than the median tooth and filamentous; ungual outer side with one pair of lateral teeth and 1 unpaired dorsal tooth (Figs 6D–F). Unguiculi wing-shaped, with 4 smooth lamellae, anterointernal lamella with a large tooth (Fig. 6D). Tenent hairs capitate, longer than the inner distal smooth chaeta on tibiotarsus III (Fig. 6D).

Anterior face of colophore (Figs 7A–C) with 2–3 ciliate chaetae, none of them clearly thicker than the others (Fig. 7A), posterior face with 3 ciliate chaetae (1 unpaired), 2 smooth small spines and 1–3 long, smooth chaetae (Fig. 7B). Lateral flap with 2 smooth chaetae (Fig. 7C).

Dorsal side of manubrium with about 60+60 chaetae. Manubrial plate with 2 chaetae and 2 pseudopores (Fig. 7D). Dens dorsally with 8–10 inner and 8 outer feathered chaetae, with regular ciliate chaetae between the feathered ones; 1 inner smooth or ciliate chaeta near mucro (**i1**); apex of dens with 1 long, robust feathered chaeta, at least twice as long as the mucro length (Fig. 7E). Mucro of the *tridenticulati* group, teeth formula as *aAi*, apical tooth (*a*) followed by a well-developed tooth (*A*) plus two paired reduced teeth (*i*) on the inner and outer lamellae (Fig. 7F). Ratio of mucro:dens:manubrium of holotype = 1:5.7:7.83.

Etymology. The species is named after the Caatinga biome, where Boa cave is located.

Remarks. The new species is unique within the genus by the combination of the following characters: unguis basal posterior tooth much larger than basal anterior tooth, unpaired apical tooth present, long and filamentous, tenent hairs capitate; femur III with smooth spine-like smooth chaetae; posterior face of colophore with 3 ciliate chaetae (1 unpaired), 2 small, smooth spines and 1 long, smooth distal chaeta; dens dorsally with 8–10 inner and 8 outer feathered chaetae; mucro short, of the *tridenticulati* group, with tooth formula as: *aAi sensu* Delamare-Deboutteville (1948).

Cyphoderus caatinguensis **sp. nov.** resembles other Neotropical species of the *tridenticulati* group with similar mucronal teeth formula (*aAi* or *aAA*). However, the new species can be distinguished from all of them by the combination of the presence of a single **m** chaeta on the labial basomedian field and a reduced spiny **l2** on the basolateral field, one central macrochaeta on the Abd. IV, unguis with an unpaired apical tooth, long and filamentous, and dens dorsal chaetotaxy (see Table 1). Considering the mucronal morphology and labial and Abd. IV chaetotaxy, *C. manuneru* Bernard, Soto-Adames & Wynne, 2015 is arguably the closest Neotropical species to *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.**, but they can be distinguished from each other by the number of spine-like chaetae on the trochanteral organ (16–19 in *C. caatinguensis* **sp. nov.** vs. 10 in *C. manuneru*), absence of the ungual unpaired apical tooth in *C. manuneru* (present and filamentous in the new species), tenent hair shape (capitate in the new species vs. acuminate in *C. manuneru*) and number of the inner and

outer dorsal feathered chaetae on dens (8–10 + 8 in *C. caatinguensis* **sp. nov.** vs. 4 + 7 in *C. manuneru*). Further comparisons between the Neotropical species of the *tridenticulati* group are provided in Table 1.

It is noteworthy the new species' absence of pigments and eyes do not constitute any troglomorphism, since such morphology is shared among all Cyphoderini, which can live in many different habitats, including epigeic environments (Delamare-Deboutteville 1948; Thibaud & Najt 1987; Oliveira *et al.* 2023). On the other hand, the strong modifications of the inner teeth seen in the unguis of *C. caatinguensis* **sp. nov.** may actually represent troglomorphic traits, as discussed by Christiansen (1961), despite the new species having tenent hairs capitate, a feature that suggests an edaphic life form. We sampled the entrance of the Boa cave and its external surroundings, as well as several other caves in the region, and did not find any specimens of the new species. This absence provides good evidence of a troglobitic species with a very restricted distribution.

Habitat, threats and conservation status. Boa cave stands as the sole documented habitat of *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** It boasts relatively expansive dimensions for the region, spanning approximately 340 meters in length and encompassing a volume exceeding 10,000 m³ (Fig. 1E). However, its access is limited by a narrow, vertical entrance situated at the base of a sinkhole. Consequently, the microclimate within the cave is characterized by elevated temperatures, high humidity, and remarkable stability.

This cave has only a small isolated subterranean stream present at its lowest level. Consequently, the primary organic resources for cave fauna consist of extensive patches of guano deposited by thousands of Chiroptera, including the hematophagous hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata* Spix) common vampire bat (*Desmodus rotundus* (Geoffroy Saint-Hilaire)), the frugivorous flat-faced fruit-eating bat (*Artibeus planirostris* (Spix)) and the omnivorous pale spear-nosed bat (*Phyllostomus discolor* Wagner) (Vargas-Mena *et al.* 2018).

Although Boa Cave and its immediate environs exhibit a relatively preserved state, the limestone outcrop housing the cave has undergone significant alteration owing to irregular limestone mining activities. Furthermore, there are additional areas in the vicinities which have been impacted, mainly due to deforestation and agricultural practices. However, these alterations are situated at a distance from the cave, and it cannot be definitively stated that they are adversely affecting its fauna. Consequently, due to the uncertainties regarding the potential impacts of these human activities on *C. caatinguensis* **sp. nov.** could be classified for now as a Data Deficient (DD) species, according to the International Union for Conservation of Nature's method for assessing the risk of extinction (IUCN 2022).

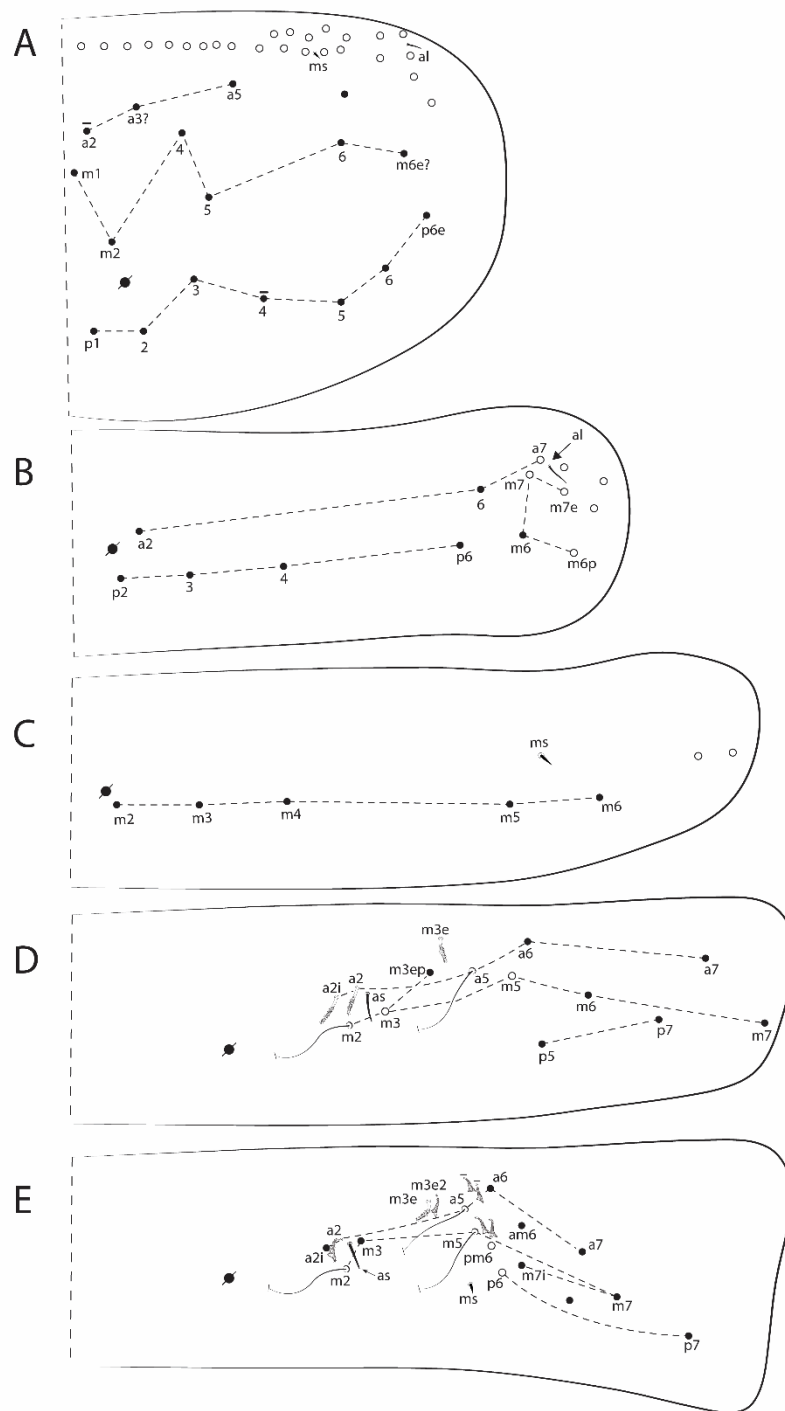


FIGURE 4. *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** dorsal trunk chaetotaxy, right side: **A**, Th. II; **B**, Th. III; **C**, Abd. I; **D**, Abd. II; **E**, Abd. III. Abbreviations: **ms** = microsensillum, **al** = anterolateral sensillum, **as** = anterosubmedial sensillum.

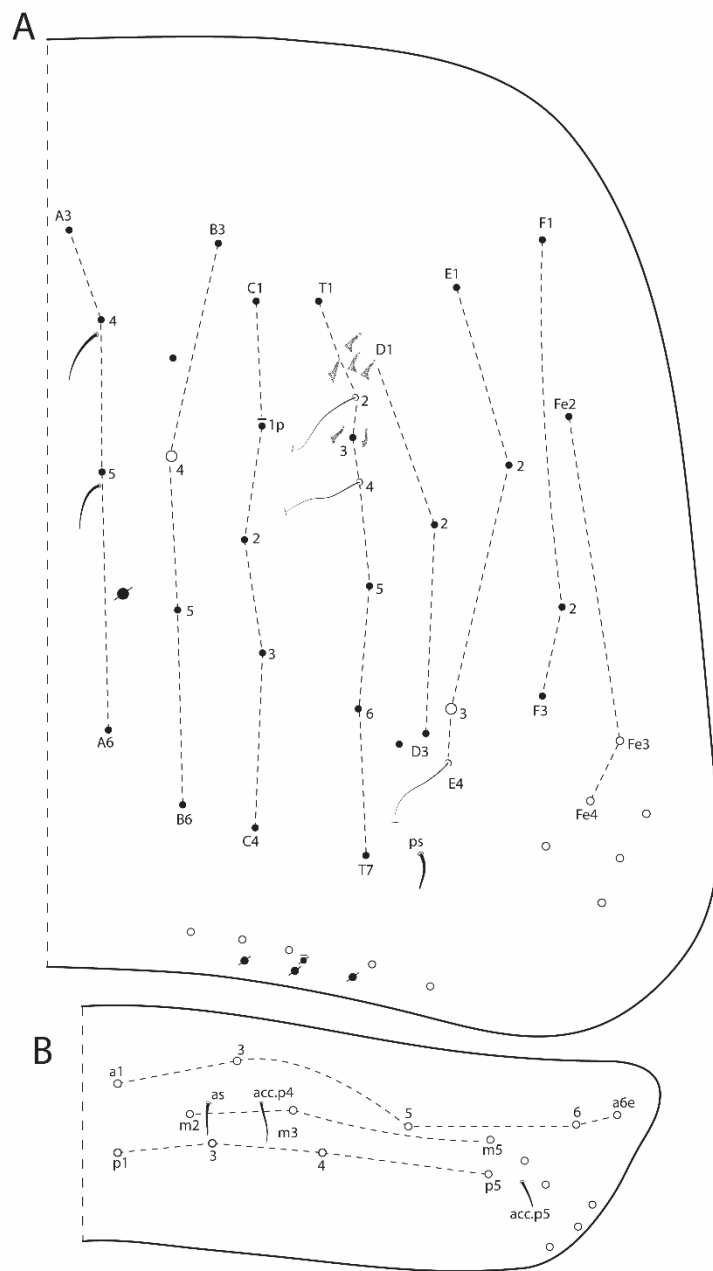


FIGURE 5. *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** dorsal trunk chaetotaxy, right side (cont.): **A**, Abd. IV; **B**, Abd. V.

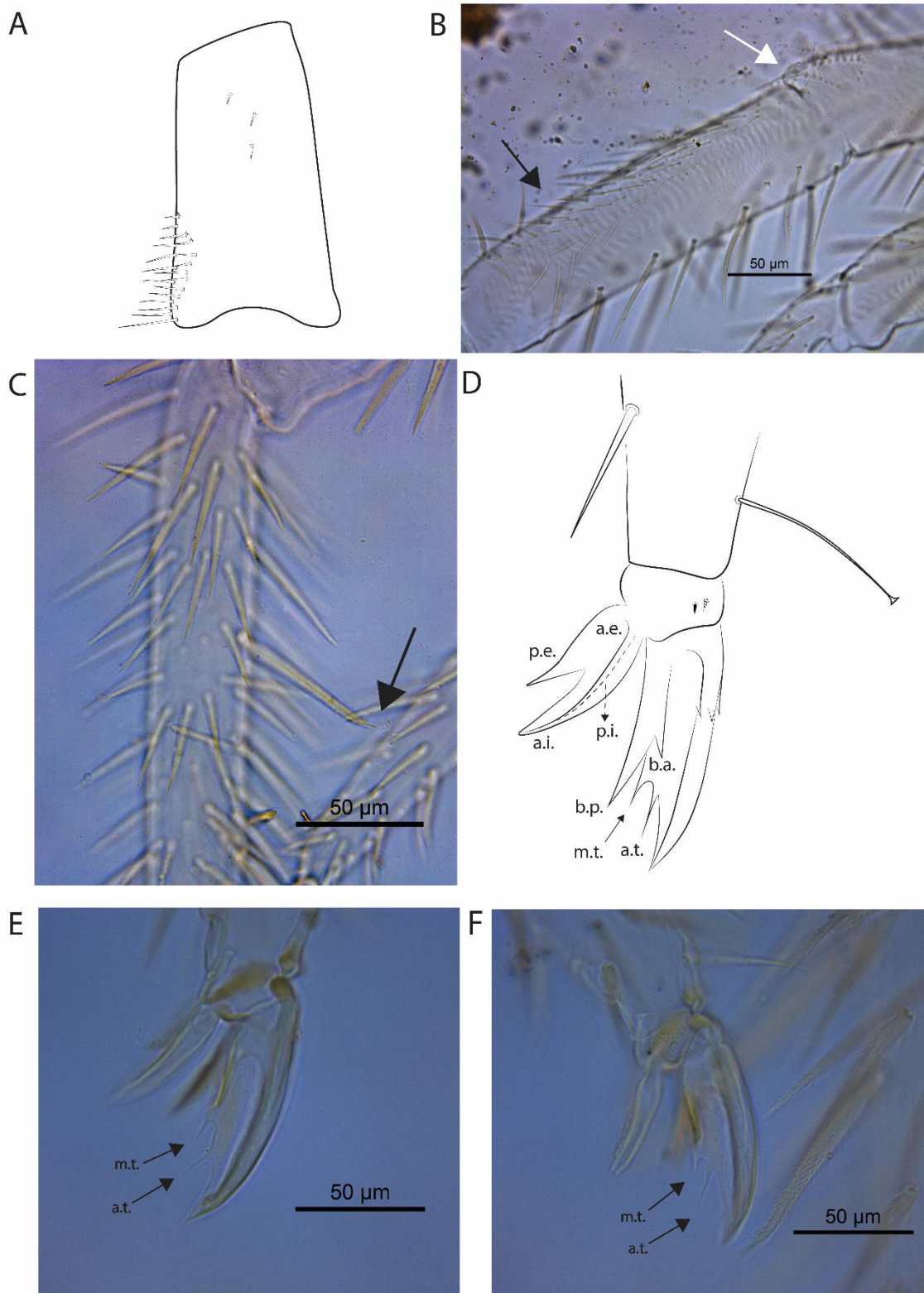


FIGURE 6. *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** legs: **A**, Trochanteral organ spine-like chaetae; **B**, Trochanteral organ (white arrow) and femur III (black arrow) with smooth spine-like chaetae; **C**, Tibiotarsus III internal mac with abruptly pointed apex (black arrow); **D**, Foot complex III, anterior view; **E–F**, Ungues II (**E**) and III (**F**), respectively, black arrows mark the medial and apical teeth. Abbreviations: **b.a.** = basal anterior tooth, **b.p.** = basal posterior tooth, **m.t.** = unpaired median tooth, **a.t.** = unpaired apical tooth, **a.e.** = anteroexternal lamella; **a.i.** = posteroexternal lamella; **p.e.** = anterointernal lamella; **p.i.** = posterointernal lamella.

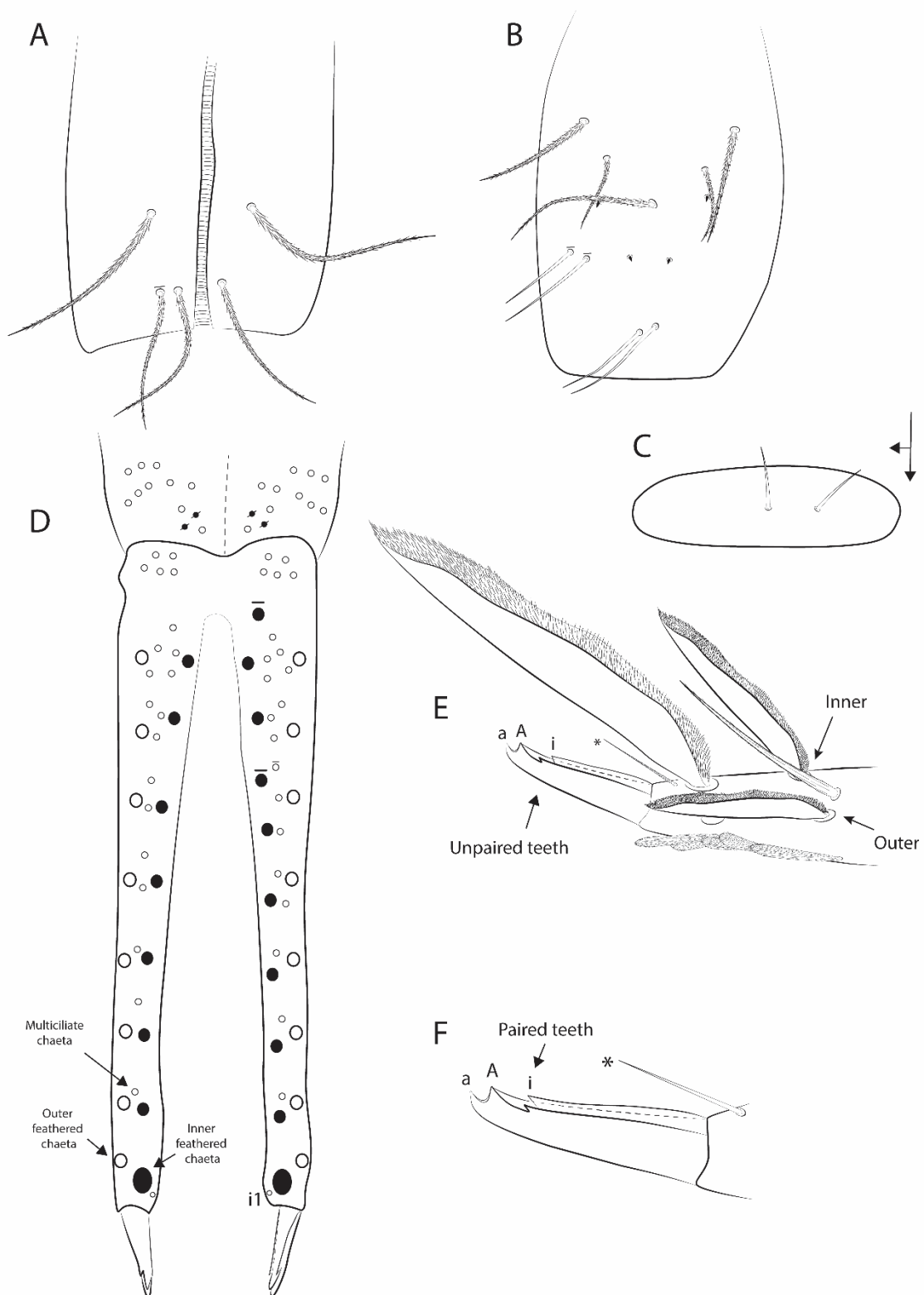


FIGURE 7. *Cyphoderus caatinguensis* sp. nov. abdominal appendages: **A**, Collophore anterior side; **B**, Collophore posterior side; **C**, Collophore lateral flap; **D**, Distal part of manubrium and dorsal dens chaetotaxy of dens, dorsal side. **E**, Mucro and dens with distal feathered chaetae; **F**, Mucronal teeth in detail, '*' marks the apical smooth chaeta.

Order Symphypleona Börner, 1901 *sensu* Bretfeld, 1986
Suborder Appendiciphora Bretfeld, 1986
Superfamily Sminthuroidea Bretfeld, 1994
Family Sminthuridae Lubbock, 1862
Subfamily Sminthurinae Lubbock, 1862 *sensu* Bretfeld, 1999

Genus *Pararrhopalites* Bonet & Tellez, 1947

Diagnosis. Ant. IV with 8–15 subsegments. Eyes from 8+8 to completely absent, body pigments variable. Head and posterior trunk with dorsal spines. Post-antennal chaeta absent. Bothriotricha **A–D** present, **E** absent. Neosminthuroid chaetae on the parafurcal area absent. Metatrochanteral spine present. Ungues with or without tunica, unguiculi with apical filament, capitate tenent hairs absent. Female subanal appendage elongated and simple. Dens ventrally with 7–14 chaetae. Mucro with inner and outer lamellae serrated, mucronal chaeta present or absent (adapted from Bonet & Tellez 1947; Betsch 1980; Zeppelini & Brito 2014; Brito *et al.* 2019; Medeiros *et al.* 2020).

***Pararrhopalites iataganii* sp. nov. Souza, Medeiros & Zeppelini**

Figs 1, 8–12, Table 2



FIGURE 8. *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. live specimen in its natural habitat. Photograph by Diego Bento (2021).

Type material. Holotype male in slide: Brazil, Rio Grande do Norte State, Baraúna, Furna Nova Cave (05°02'03.8"S; 37°34'15.8"W), Aphotic zone, 18/VII/2022, Souza, P.G.C, Santos, N. M. C., Lima, E. C. A., Bento, D. M., Freitas, J. I. M. coll. (CC/UFRN). Paratypes: 4 females in slides, same data of holotype (CC/UFRN); 2 females in slides, same data of

holotype except (CRFS/UEPB); and 3 males, 2 females and 1 juvenile in slides, same data of holotype except 18/VIII/2022 (CC/UFRN).

Diagnosis. Specimens pale yellow, some individuals with scattered red pigment on dorsal head and body. Antennae shorter than the body length, Ant. IV with 12 subsegments. Eyes 1+1, head interantennal area with 3 reduced, apically rounded sensilla, frontal area with 13 spines. Parafurcal area with 12 chaetae. Ungues without tunica, with a pair of lateral teeth. Manubrium with 6+6 dorsal chaetae, dens with 23 dorsal (posterior) and 9 ventral (anterior) chaetae, ventral formula from the apex to the basis as: 3, 2, 2, 1...1. Mucronal chaeta absent.

Description. Body (head + trunk) average length of the type series 0.75 mm (0.5–1.1 mm), holotype with 0.64 mm, males averaging 0.57 mm (0.5–0.67 mm) (n=4), females averaging 0.83 mm (0.65–1.1 mm) (n=4). Specimens usually pale (Fig. 8), some individuals with scattered red pigment on the dorsal head and large abdomen.

Antennal length in holotype 0.75 mm. Antennal segments ratio I: II: III: IV of the holotype as 1: 2.5: 5.3: 11.5. Ant. IV shorter than body length (Fig. 8). Ant. IV with 12 subsegments, subsegments 1–12 with 4/6/6/7/8/10/10/10/10/10/10/26 chaetae, respectively; subsegment 12 with one curved chaeta and one small sensillum at the apex (Fig. 9A). Ant. III with 21 chaetae plus one short sensillum (**Aai**) laterally to the sensory organ; apical organ sensory rods in independent shallow invaginations (Fig. 9B). Ant. II with 15 chaetae, 4 of them spine-like, plus 1 rounded apical microsensillum (Fig. 9C). Ant. I with 7 chaetae (Fig. 9C). Eyes 1+1, unpigmented. Clypeal area **a–g** series with 6/6/4/4(+1)/5(+1)/4(+1)/3 chaetae, respectively, 1 chaeta present or absent between series **d** and **e**; interantennal area with 1 oval organ and 3 reduced, apically rounded sensilla, **α** and **γ** series with 1 chaeta each, frontal area **A–E** series with 2/1/2/2(+1)/2 chaetae, respectively, with a total of 13 frontal spines (Fig. 9D). Ventral head with 3 **a** and 1 **b** chaetae on the post-labial region, plus 3 elongate oval organs, labial basomedian field with 7 and basolateral field with 2 chaetae, respectively (Fig. 9E). Six prelabral chaetae present (Fig. 9D), labral **p**, **m**, **a** series with 5, 5, 4 chaetae, respectively, **p2** longer than the others; **m0** smaller than **m1**, labral intrusions present, labral papillae absent (Fig. 9F). Labial palp with 5 proximal chaetae, with 6 papillae, formula of the guards as: **H**(2), **A**(0), **B**(5), **C**(0), **D**(3), **E**(4) + a lateral process not reaching the apex of the papilla **E**, 1 papilla **B** guard-chaeta laterally displaced to **C**, large, curved and blunt (Fig. 9G). Maxillary outer lobe apical chaeta with a basal toothlet, basal chaeta shorter than the apical one, oral fold with 2 chaetae, sublobal plate without chaeta-like appendages (Fig. 9I). Mandibles asymmetrical with 5 + 3 apical teeth (Fig. 9I). Maxillae globular, without any clear modifications (Fig. 9J).

Large abdomen without clear segmentation, constrictions or vesicles. **DI-1** row of dorsal spines present on females, absent on males (Figs 10A–B). Th. II with 1 **a** chaeta and 1 **m** spine. Th. III with 1 **a** chaeta, 1 **m** and 1 **p** spines. Abd. I with 1 chaeta and 1 spine on **a** and **m** rows, and 3 **p** spines. Bothriotricha **A**, **B** and **C** present on Abd. II, slightly misaligned, nearly in a straight line; Abd. II with 2 chaetae, 1 spine on **a** row, plus bothriotrichum **A**; 3 chaetae and 1 spine on **m** row, plus bothriotrichum **B**; and 5 chaetae on **p** row, plus bothriotrichum **C**. Abd. III–IV with 7 chaetae under the bothriotrichum **C**. Abd. III–IV dorsal spine rows **dI-1** with 9 spines in females, row absent in males; **dII-1** with 6 spines in females and 8 in males; **dIII-1** with 7 spines in females and 6 in males; **dIV-1** with 5 spines in females and 4 in males; and **dV-1** with 8 in females and 7 in males (Figs 10A–B). Parafurcal area with 12 chaetae in both sexes, distributed in 4 rows of 2, 4, 3 and 3 chaetae (Fig. 10A). Bothriotrichum **D** present on the small abdomen of both sexes, with 4 accessory chaetae on females and 3 on males (Figs 10C–D). Female dorsal anal valve with **as2–4**, **ams1–3**, **ms1–3**, **mps1–3** and **ps1–2** chaetae, **ams1**, **ms1** and **ps1** unpaired; each ventral anal valve with **aai1–3**, **ai1–4**, **mi1–2**, **mpi1–5** and **pi1–3** chaetae, **ami1** as an oval organ, **mi2** bothriotrichum-like and **mpi5** as the subanal appendage, smooth and curved towards the anal opening (Fig. 10C).

Male dorsal anal valve with **as2–4**, **ams1–3**, **ms1–3**, **mps1**, **mps3**, and **ps1–2** chaetae, **ams1**, **ms1** and **ps1** unpaired; each ventral anal valve with **aa1–2**, **ai1–4**, **mi1–2**, **mpi1–5** and **pil–3** chaetae, **ami1** as an oval organ, **mi2** bothriotrichum-like (Fig. 10D). Female genital plate with 2+2 chaetae on ventral side (Fig. 10E). Male genital plate with about 10+10 chaetae (Fig. 10F).

Legs (Figs 11, 12A–C): Epicoxae I–III with 1, 1 and 2 chaetae, respectively. Subcoxa I–III with 0, 1 and 1 chaetae, respectively. Coxae I–III with 1, 2 and 4 chaetae, respectively. Trochanters I–III with 5, 3–5 and 6 chaetae, respectively, trochanter III with one chaeta modified into a thick and bent metatrochanteral spine, trochanters II–III with 1 and 1–2 oval organs, respectively. Femora I–III with 14, 14, 15 chaetae and 1, 1, 1 oval organs, respectively (Figs 11A–C). Tibiotarsi I–III with 54, 51, 54 chaetae and 3, 3, 3 oval organs, respectively, distal whorl with 9 chaetae on each leg (Figs 11D–F). Foot complexes I–III with 2 pretarsal chaetae each, one of them larger than the other (Figs 12A–C). Ungues without tunica, with a single medial inner tooth (larger on unguis III), 2 paired small lateral teeth and 1 dorsal tooth (not seen in unguis III, possibly reduced or absent). Unguiculus I without teeth, unguiculi II–III with a small inner tooth, apical filament slightly surpassing the apex of unguis on leg I, reaching the apex on leg II but not reaching the apex on leg III (Figs 12A–C).

Abdominal appendages (Figs 12D–G): Collophore with 0+0 or 1+1 chaetae on the lateral flaps, corpus without chaetae. Tenaculum ramus with 3 teeth plus an apically rounded basal appendix, corpus with 1–2 apical chaetae. Manubrium with 6+6 chaetae, all dorsal, one larger than the others (Fig. 12D). Dens dorsally (posteriorly) with 23 chaetae, lines **E/PE/P/PJ/J** with 7/2/1/7/6 chaetae, respectively (Fig. 12E), ventrally (anteriorly) with 9 chaetae following the formula from the apex to the basis: 3, 2, 2, 1...1 (Fig. 12F). Mucronal lamellae serrated, inner lamella with about 30, outer lamella with about 16 teeth; mucronal chaeta absent (Fig. 12G). Ratio manubrium:dens:mucro of the holotype as 1: 3.3: 1.4.

Etymology. The new species honors our dear friend, the biospeleologist José Iatagan Mendes de Freitas, for his indispensable work at the Furna Feia National Park, Rio Grande do Norte, and all other contributions with the National Center for Cave Research and Conservation (CECAV/ICMBio) in prospecting and mapping new caves through Brazil.

Remarks. The combination of Ant. IV with 12 subsegments, 1+1 eyes, head interantennal area with 3 apically rounded sensilla and frontal area with 13 spines, unguis with a pair of lateral teeth, manubrium with 6 dorsal chaetae, dens with 23 dorsal chaetae, with ventral chaetotaxy formula as 3, 2, 2, 1...1, and mucro without chaeta sets *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.** apart from all its congeners. Considering the number of eyes (1+1), the new species resembles other Neotropical taxa like *P. queirozi* Brito, Lima & Zeppelini, 2019, *P. sideroicus* Zeppelini & Brito, 2014 and *P. wallacei* (Zeppelini & Palacios-Vargas, 1995). However, *P. iataganii* **sp. nov.** can be readily separated from them by: Ant. IV with 12 subsegments (*vs.* 11 or less in the other species), frontal head with 13 spines (15 in *P. queirozi*, 10 in *P. sideroicus* and *P. wallacei*), 1 frontal cephalic oval organ (2 in *P. sideroicus*), manubrium with 6 dorsal chaetae (less in *P. queirozi* and *P. sideroicus*, unknown to *P. wallacei*), and dens dorsally with 23 chaetae (less in the other species). Further comparisons between the Neotropical species of the genus are summarized in Table 2.

The reduction of pigment and eyes (just 1+1) may be considered troglomorphic traits of *P. iataganii* **sp. nov.**, since most species of *Pararrhopalites* have 2+2 or more eyes and at least some of them are pigmented (Zeppelini & Brito 2014). On the other hand, the species does not show any clear elongation of appendages, unguis or chaetae, features observed as troglomorphisms in some cave Collembola (Christiansen 1961, 1988; Souza *et al.* 2022). Specimens of *P. iataganii* **sp. nov.** were only found in the aphotic zone of Furna Nova cave, even though other zones of the cave and its aboveground surroundings were investigated.

Habitat, threats and conservation status. Furna Nova cave stands as the exclusive documented habitat of *P. iataganii* **sp. nov.**, although other caves and surface environments in the region have been surveyed. The cave has relatively large dimensions for the region, with approximately 240 meters of passages mapped thus far, while certain sections remain unexplored (Fig. 1D). Notably, the cave features only one small entrance, fostering a stable microclimate characterized by relatively high temperature and humidity levels, alongside limited air circulation. Seasonal occurrences of elevated carbon dioxide concentration are observed at lower cave levels, including areas where individuals of *P. iataganii* **sp. nov.** were collected.

The cave primarily maintains occasional drips and small puddles observed in its lower sections. Consequently, the principal organic resources for cave fauna predominantly comprise guano patches, primarily deposited by the hematophagous bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*, the Brazilian funnel-eared bat *Natalus macrourus* (Gervais), an insectivore, and the omnivorous bat *Phyllostomus discolor* (Vargas-Mena *et al.* 2018).

Furna Nova cave is situated within the Furna Feia National Park, designated in 2012 to safeguard a notable cluster of caves and the biodiversity of the Caatinga biome (Brasil 2012). While the area of the National Park itself is well conserved, its periphery has undergone substantial changes, mainly due to irrigated agriculture. Nonetheless, these anthropogenic influences are situated at a considerable distance from the cave and do not seem to exert any discernible impact on its subterranean environments.

The Furna Nova cave is among the caves within the Furna Feia National Park slated for tourism. However, these visits will be conducted in an organized manner and based on studies that have considered the significance and uniqueness of its cave fauna. Notably, the lower cave level, where *P. iataganii* **sp. nov.** is found, will be off-limits to visitors, and there are plans for monitoring the bat community. Consequently, the newly discovered species could potentially be classified as Least Concern (LC) according to the International Union for Conservation of Nature's method for assessing the risk of extinction (IUCN 2022).

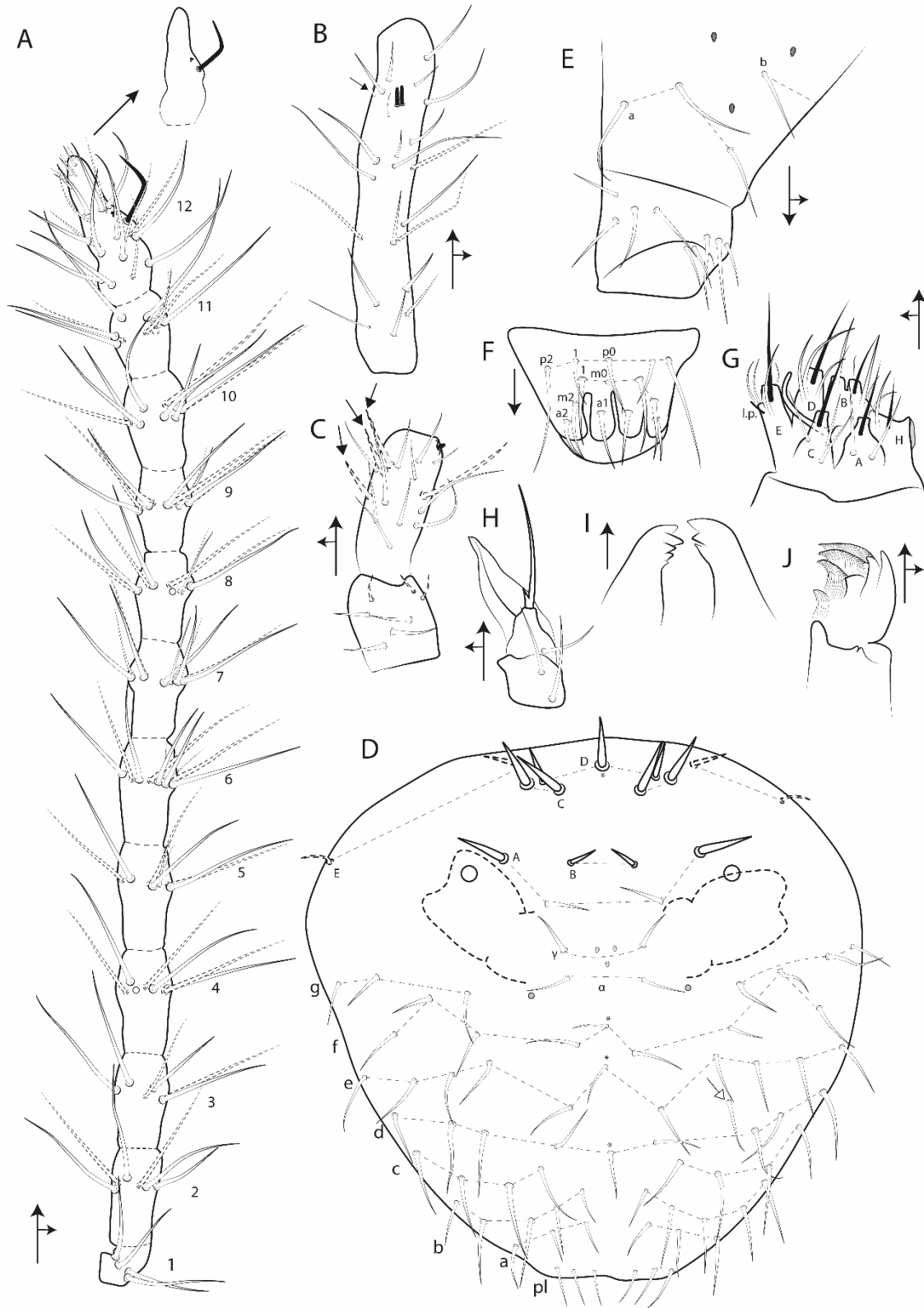


FIGURE 9. *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.** head: **A**, Right Ant. IV, dorsal view, in detail the apical curved chaeta and sensillum; **B**, Left Ant. III, ventral view, black arrow marks the lateral short sensillum; **C**, Dorsal view of the left Ant. I–II, black arrows mark the spine-like chaetae; **D**, Anterior head chaetotaxy and eyes, white arrow marks a chaeta which can be absent; **E**, Ventral head, right side, with labial basomedial and basolateral labial chaetae and post-labial region; **F**, Labral chaetotaxy; **G**, Labial palp, left side; **H**, Maxillary outer lobe and sublobal plate (right side); **I**, apical teeth of the mandibles; **J**, Maxilla capitulum, right side.

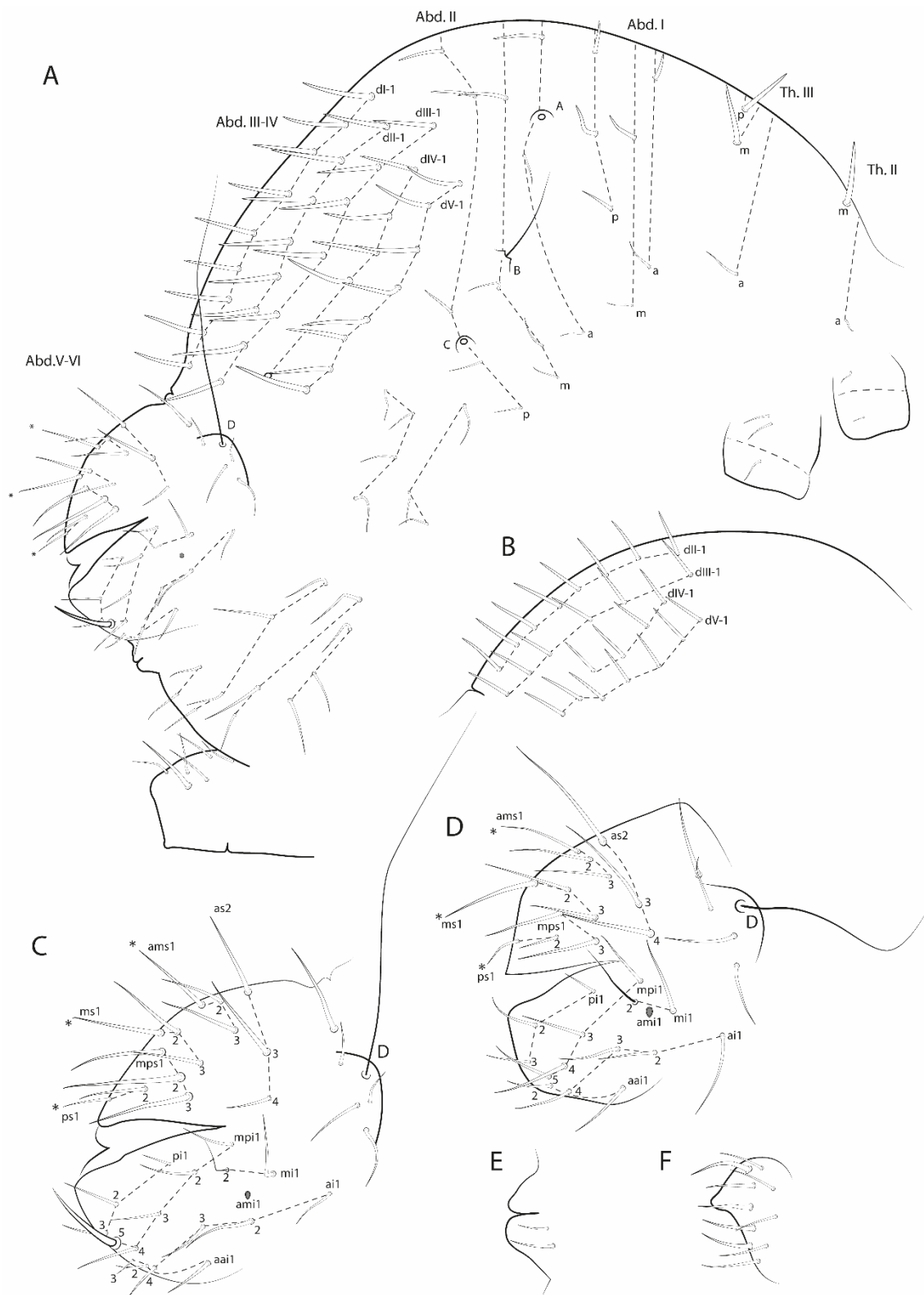


FIGURE 10. *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. trunk lateral view: **A**, Large abdomen chaetotaxy of a female; **B**, Dorsal spines of the posterior male large abdomen; **C**, Female anal valves chaetotaxy, “*” mark unpaired chaetae; **D**, Male anal valves chaetotaxy, “*” mark unpaired chaetae **E**, Female genital plate; **F**, Male genital plate.

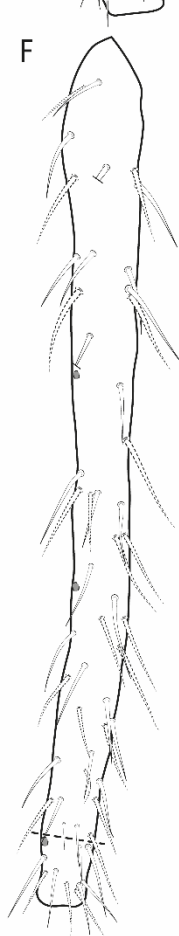
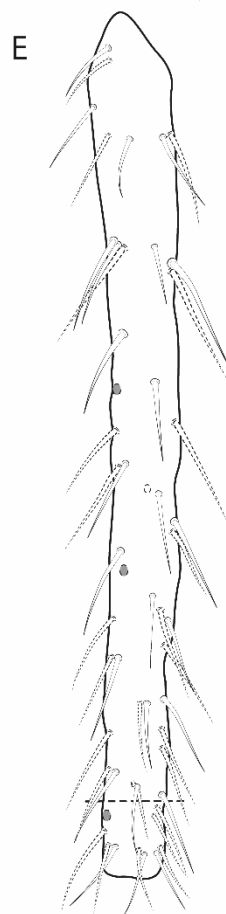
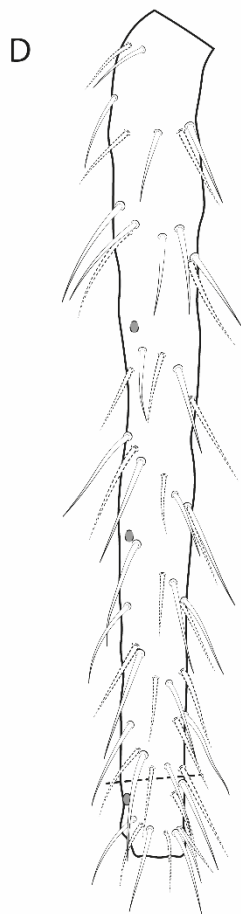
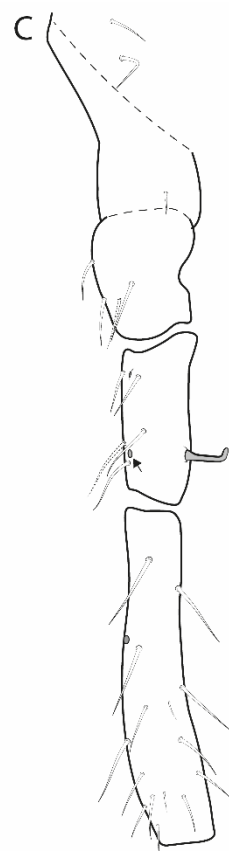
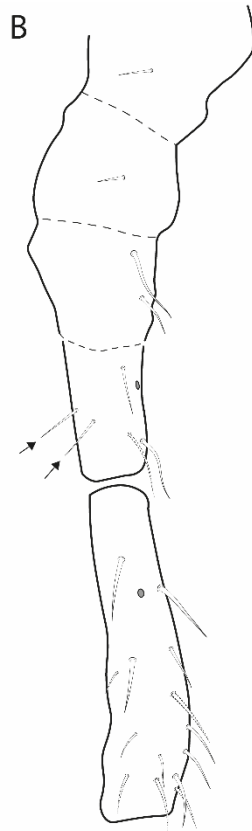
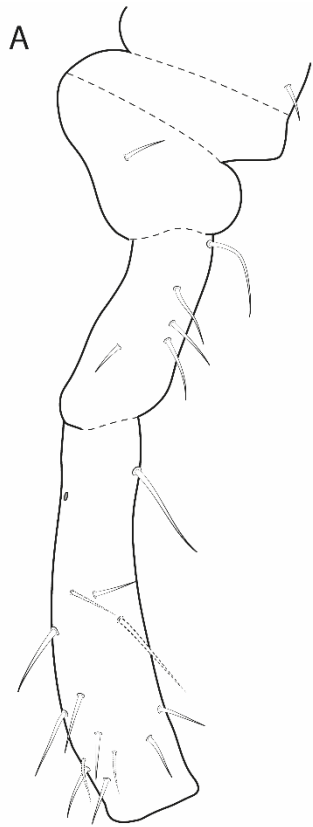


FIGURE 11. *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. legs: **A**, Epicoxa to femur of leg I; **B**, Epicoxa to femur of leg II (arrows indicate chaetae present or absent); **C**, Epicoxa to femur of leg III (arrows indicates oval organ present or absent); **D**, tibiotarsus I; **E**, tibiotarsus II; **F**, tibiotarsus III.

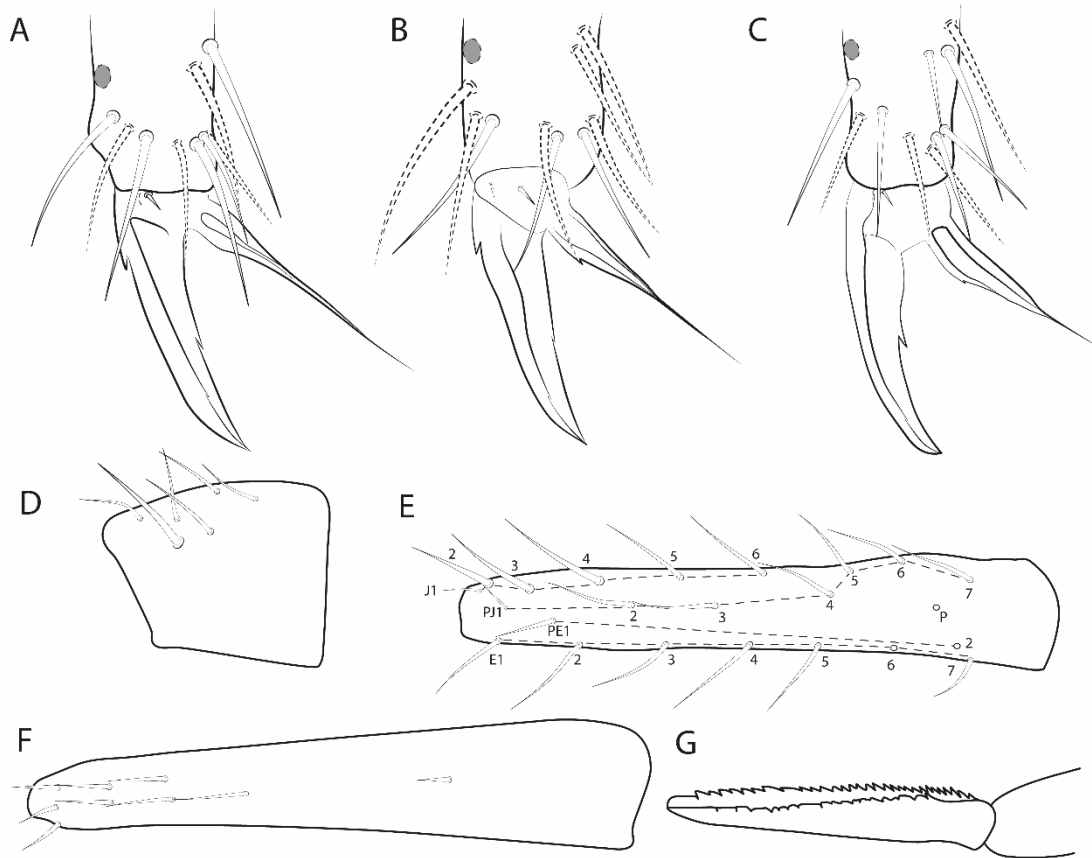


FIGURE 12. *Pararrhopalites iataganii* sp. nov. trunk appendages: **A–C**, Foot complex I–III; **D**, Manubrium, dorso-lateral view; **E**, Dens, dorsal chaetotaxy; **F**, Dens, ventral chaetotaxy of the dens. **G**, Mucro, external view.

Discussion

Morphology of the foot complex, dens and mucro have been traditionally used as the main features to differentiate species of *Cyphoderus* and *Pararrhopalites*, as well as many other genera of springtails, especially in Entomobryomorpha and Symphypleona orders. The lack of more detailed descriptions on the chaetotaxy of head, trunk and appendages, especially in taxa published before 1950, can lead to difficulties in the identification, differentiation and description of new species for the science. Some examples of such difficulties have been recently investigated, such as in *Lepidocyrtus* Bourlet, 1839, *Entomobrya* Rondani, 1861 (Entomobryomorpha), *Sphaeridia* Linnaniemi, 1912 and *Denisiella* Folsom & Mills, 1938 (Symphypleona) (Katz *et al.* 2015; Winkler *et al.* 2020; Medeiros *et al.* 2023). The same issues can be observed in older descriptions of *Cyphoderus* and *Pararrhopalites*, which are mostly based on the morphology of foot complex and furca, preventing a better understanding of the infrageneric morphological variation within each genus, presence of species complexes and the real distribution of species-level taxa.

The recent studies provided new diagnostic characters to separate similar or even previously considered cryptic species (Jantarit *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2018; Cipola *et al.* 2020; Zeppelini *et al.* 2022). For example, a comparison of recently described Brazilian *Pararrhopalites* species demonstrated differences in the chaetotaxy of the antennae, clypeus,

abdomen and legs between them (Palacios-Vargas & Zeppelini 1996; Zeppelini & Palacios-Vargas 1999; Zeppelini & Brito 2014; Zeppelini *et al.* 2018; Brito *et al.* 2019). Such differences were not highlighted in this study since we found more obvious traits to separate the taxa (see Table 2). However, these detailed data may be used in the future to separate very similar or cryptic species of *Pararrhopalites*, or even can be tested as diagnostic traits using an integrative perspective of taxonomic tools.

Our study presents the second and third new species of cave Collembola recorded from Caatinga biome, the main semiarid domain of Brazil (Souza *et al.* 2022). *Pararrhopalites iataganii* **sp. nov.** is the seventh and *Cyphoderus caatinguensis* **sp. nov.** is the 16th species of their respective genera recorded from Brazil (Zeppelini *et al.* 2024a, 2024b). The species descriptions contribute to a better understanding of the invertebrate fauna of the Neotropical Region, and to support future conservation policies for the sampled areas.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. Ernest C. Bernard and Dr. Ľubomír Kováč for their many important suggestions and corrections to improve this manuscript. We also thank the speleologist José Iatagan Mendes de Freitas for guiding us in and out of the caves, as well as Dr. Estevam Cipriano Araujo de Lima and Ms. Nathália Michelly da Cunha Santos for their efforts in helping us to sample the specimens in the field, and Dr. João Victor Lemos for revising the original draft. This research was partially funded by Term of Commitment of Speleological Compensation (TCCE) 01/2018, signed between Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) and Vale S.A. and with resource management by the Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade (IABS); Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ/PB, PhD scholarship, grant number #07/2021-SEECT—Paolla Gabryelle Cavalcante de Souza); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant number #309114/2021-7—Bruno Cavalcante Bellini; and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), grant number #001—Gleyce da Silva Medeiros.

References

- Bellinger, P.F., Christiansen, K.A. & Janssens, F. (1996–2024) Checklist of the Collembola of the World. Available from: <http://www.collembola.org> (Accessed 10 January 2024)
- Bernard, E. C., Soto-Adames, F. N. & Wynne, J. J. (2015) Collembola of Rapa Nui (Easter Island) with descriptions of five endemic cave-restricted species. *Zootaxa*, 3949(2), 239–267.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3949.2.6>
- Betsch, J.M. (1980) Eléments pour une monographie des Collemboles Symphypléones (Hexapodes, Aptérygotes). *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Nouvelle Série A, Zoologie*, 116, 1–227.
- Betsch, J.M. (1997) An ontogenetically focused chaetotaxial scheme in Symphypleona (collembolan): The 6th abdominal segment. *Pedobiologia*, 41, 13–18.
- Betsch, J.M. & Waller, A. (1994) Chaetotaxic nomenclature of the head, thorax and abdomen in Symphypleona (Insecta, Collembola). *Acta Zoologica Fennica*, 195, 5–12.
- Bento, D.M., Souza-Silva, M., Vasconcellos, A., Bellini, B.C., Prous, X. & Ferreira, R.L. (2021) Subterranean “oasis” in the Brazilian semiarid region: neglected sources of biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, 30, 3837–38571.
<https://doi.org/10.1007/s10531-021-02277-6>

- Bezerra, F.H.R., Takeya, M.K., Sousa, M.O.L. & Nascimento, A.F. (2007) Coseismic reactivation of the Samambaia fault, Brazil. *Tectonophysics*, 430, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2006.10.007>
- Bonet, F. & Tellez, C. (1947) Un nuevo genero de Esminturidos (Collembola). *Revista de la Sociedad Mexicana Historia Natural*, 8, 193–203.
- Börner, C. (1901) Neue Collembolenformen und zur Nomenclatur der Collembola Lubbock. *Zoologischer Anzeiger*, 24, 696–712.
- Börner, C. (1903) Über neue Altweltliche Collembolen, nebst Bemerkungen zur Systematik der Isotominen und Entomobryinen. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin*, 129–182. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.29866>
- Börner, C. (1906) Das System der Collembolen nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamburger Naturhistorischen Museums. *Mitteilungen aus dem Naturhistorischen Museum in Hamburg*, 23, 147–188.
- Börner, C. (1913) Neue Cyphoderinen. *Zoologischer Anzeiger*, 41, 1–11.
- Bourlet, A. (1839) Mémoire sur les Podures. *Mémoires de la Société Royale des Sciences, de L'Agriculture et des Arts de Lille*, 1, 377–417.
- Brasil - Decreto de 5 de junho de 2012 (2012). Dispõe sobre a criação do Parque Nacional da Fuma Feia, nos municípios de Baraúna e Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- Bretfeld, G. (1986) Phylogenetic systematics of the higher taxa of Symphypleona Börner, 1901 (Insecta, Entognatha, Collembola). *Proceedings of the 2nd International Seminar on Apterygota*, 1, 302–311.
- Bretfeld, G. (1994) *Sturmius epiphytus* n. gen. n. spec. from Colombia, a taxon of the Symphypleona (Insecta, Colembola) with an unexpected character combination. Description and position in non-Linnean and Linnean classifications of the Symphypleona. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 32, 264–281.
- Bretfeld, G. (1999) *Synopses on Palaearctic Collembola, Volume 2. Symphypleona*. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums, Göttingen, 71, 1–318.
- Brito, R. A., Lima, E. C. & Zeppelini, D. (2019) Three new species of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) from Brazil. *Zootaxa*, 4700(4), 401–430. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4700.4.1>
- CANIE/CECAV (2022). Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas. Available from: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/cadastro-nacional-de-informacoes-espeleologicas/canie> (Accessed 30 December 2022)
- CANIE/CECAV (2024) Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas. Available from: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/cadastro-nacional-de-informacoes-espeleologicas/canie> (Accessed 12 October 2023)
- IBGE (2024) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/malhas-territoriais/15774-malhas.html> (Accessed 12 October 2023).
- Cassagnau, P. (1963) Collemboles d'Amérique du Sud, II. Orchesellini, Paronellinae, Cyphoderinae. In: in Delamare Deboutteville, C. & Rapoport, E., *Biologie de la Amérique Australe*, Volume II, Études sur la faune du sol, Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 127–148.
- Castro-Souza, R. A., Zefa, E., & Ferreira, R. L. (2017) Two new species of cave crickets *Endecous* (*Notoendecous*) Gorochoy, 2014 (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae) from northeastern Brazil. *Zootaxa*, 4318(3), 474–498. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4318.3.3>
- Chen, J-X. & Christiansen, K.A. (1993) The genus *Sinella* with special reference to *Sinella* s. s. (Collembola: Entomobryidae) of China. *Oriental Insects*, 27, 1–54.

- Christiansen, K. (1961) Convergence and parallelism in cave Entomobryinae. *Evolution*, 15, 288–301.
- Christiansen, K. (1988) *Pseudosinella* revisited (Collembola, Entomobryinae). *International Journal of Speleology*, 17, 1–29.
- Cipola, N. G., Arbea, J., Baquero, E. & Jordana, R. (2018) The survey of *Seira* Lubbock, 1870 (Collembola, Entomobryidae, Seirinae) from Iberian Peninsula and Canary Islands, including three new species. *Zootaxa*, 4458(1), 66 pp. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4458.1.1>
- Cipola, N. G., Oliveira, J. V. L., Bellini, B. C., Ferreira, A. S., Lima, E. C., Brito, R. A., Stievano, L. C., Souza, P. G. C. & Zeppelini, D. (2020) Review of Eyeless *Pseudosinella* Schäffer (Collembola, Entomobryidae, and Lepidocyrtinae) from Brazilian Caves. *Insects*, 11(3), 194. <https://doi.org/10.3390/insects11030194>
- Delamare-Deboutteville, C. (1948) Recherches sur les Collemboles Termitophiles et Myrmécophiles. *Archives de Zoologie Expérimentale et Generale*, 85, 261–425.
- Delamare-Deboutteville, C. & Massoud, Z. (1963) Collemboles symphypléones. In *Biologie de L'Amérique Australe*, 1st ed.; Delamare-Deboutteville, C. & Rapoport, E., Eds.; Éditions du CNRS: Paris, France, Volume 2, pp. 169–289.
- Denis, J. R. (1923) Sur la française des Aptérygotes. IV. Note préliminaire. *Bulletin de la Société entomologique de France*, 92, 53–58.
- Fjellberg, A. (1999) The Labial Palp in Collembola. *Zoologischer Anzeiger*, 237:309–330.
- Folsom, J. W. & Mills H.B. (1938) Contribution to the knowledge of the genus *Sminthurides* Börner. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 82, 231–274.
- Gisin, H. (1967) Espèces nouvelles et lignées évolutives de *Pseudosinella* endogés. *Mémorias e estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra*, 301, 5–25.
- Godeiro, N. N., Ding, Y., Cipola, N. G., Jantarit, S., Bellini, B. C. & Zhang, F. (2023) Phylogenomics and systematics of Entomobryoidea (Collembola): marker design, phylogeny and classification. *Cladistics*, 39(2), 101–115. <https://doi.org/10.1111/cla.12521>
- IUCN Standards and Petitions Committee. (2022) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 15.1. Prepared by the Standards and Petitions Committee. https://nc.iucnredlist.org/redlist/content/attachment_files/RedListGuidelines.pdf (Accessed 30 November 2022).
- Jantarit, S., Satsook, C. & Deharveng, L. (2014) *Cyphoderus* (Cyphoderidae) as a major component of collembolan cave fauna in Thailand, with description of two new species. *Zookeys*, 368, 1–21. <https://doi.org/10.3897/zookeys.368.6393>
- Katz, A. D., Giordano, R. & Soto-Adames, F. N. (2015) Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173(4), 818–840. <https://doi.org/10.1111/zoj.12220>
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 15, 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Latreille, P.A. (1802) Histoire naturelle, générale et particulière des Crustacés et des Insectes III. *F. Dufart Paris*, 15, 69–83.
- Linnaniemi, W.M. (1912) Die Apterygotenfauna Finlands, II. Spezieller Teil. *Acta Societatis Scientiarum Fennicae*, 40, 1–359.

- Lubbock, J. (1862) Notes on the Thysanura. Part, I. *Transactions of the Linnean Society of London*, 23, 429–448.
- Medeiros, G.D.S., Silva, C.D.D., França, J.S., Godeiro, N.N. & Bellini, B.C. (2023) Two new species of Sminthurididae (Hexapoda, Collembola, Symphypleona) from Brazil with notes on *Denisiella* Folsom & Mills and *Sphaeridia* Linnaniemi. *ZooKeys*, 1173, 1–41.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.1173.106855>
- Medeiros, G.D.S., Greenslade, P. & Bellini, B.C. (2020) The rare *Richardsitas* Betsch (Collembola, Symphypleona, Sminthuridae): A new species from Australia with comments on the genus and on the Sminthurinae. *Insects*, 11(8), 519.
<https://doi.org/10.3390/insects11080519>
- Merlo, R.L.S.A., Castro-Souza, R.A., Bento, D.D. M. & Ferreira, R.L. (2022) A new troglophilic species of *Erebonyx* (Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae) from Brazilian caves. *Zootaxa*, 5222(1), 83–93.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.5222.1.7>
- Mills, H.B. (1938) Collembola from Yucatan Caves. In: Pearse, A. S. *Fauna of the Caves of Yucatan*. Carnegie Institution of Washington, Washington, DC, USA, 491, pp. 183–190.
- Nicolet, H. (1842) Recherches pour servir á l'Histoire des Podurelles. *Nouvelles Mémoires de la Société Helvetica Scientiae Naturalis*, 6, 1–88.
- Nunes, R.C. & Bellini, B.C. (2018) Three new species of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha) from Brazilian Caatinga-Cerrado transition, with identification keys to Brazilian *Cyphoderus*, *Pseudosinella* and *Trogolaphysa* species. *Zootaxa*, 4420(1), 71–96.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4420.1.4>
- Oliveira, J.V.L.C., Alves, J.L.S. & Zeppelini, D. (2017) Two new *Cyphoderus* (Collembola: Paronellidae) of “*tridenticulati*” and “*bidenticulati*” groups from Brazilian Amazon. *Zootaxa*, 4350(1), 47–60.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4350.1.2>
- Oliveira, J.V.L.C., Zeppelini, D., Castaño-Meneses, G. & Palacios-Vargas, J.G. (2023) Neotropical *Cyphoderus* (Collembola: Paronellidae), with comments about myrmecophily and the description of new species. *Neotropical Entomology*, 52, 652–696.
<https://doi.org/10.1007/s13744-022-01015-z>
- Palacios-Vargas, J.G. & Wilson, J. M. (1990) *Troglobius coprophagus*, a new genus and species of cave Collembola from Madagascar, with notes on its ecology. *International Journal of Speleology*, 19, 67–73
- Palacios-Vargas, J. G. & Zeppelini, D. (1996) Seven new *Arrhopalites* (Hexapoda: Collembola) from Brazilian and Mexican caves. *Folia Entomológica Mexicana*, 93, 7–23.
- Parona, C. (1888) Res ligusticae VI. Collembola e Tisanuri finora riscontrate in Liguria. *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova*, 2(6), 133–154.
- Rondani, C. (1861) *Entomobrya* pro *Degeeria* Nic. In: Stocche, A. (Ed.), *Dipterologiae Italicae Prodrum*, 4, pp. 40.
- Souza, P.G.C., Medeiros, G.D.S., Ferreira, R.L., Souza-Silva, M. & Bellini, B.C. (2022) A highly troglomorphic new genus of Sminthuridae (Collembola, Symphypleona) from the Brazilian semiarid region. *Insects*, 13(7), 650.
<https://doi.org/10.3390/insects13070650>
- Szeptycki, A. (1979) *Chaetotaxy of the Entomobryidae and its phylogenetical significance. Morpho-systematic studies of Collembola, IV*. Polska Akademia Nauk, Zakład Zoologii Systematycznej i Doświadczalnej, Kraków, Poland, 219 pp.
- Schäffer C (1897) Apterygoten. Hamburger Magalhaensische Sammelreise Apterygoten 8: 1–48.

- Thibaud, J.-M. & Najt, J. (1987) Collemboles (Insecta) de l'Équateur II. Entomobryidae p.p., Cyphoderidae et Oncopoduridae. *Bulletin du Muséum d'histoire Naturelle*, Paris. 4(9), 933–946.
<https://doi.org/10.5962/p.287550>
- Tömösvary, Ö. (1882) Adatok hazánk Thysanura-Faunájához. *Magyar Tudományos Akadémia Matematikai és Természettudományi Közlemények*, 18, 119–131.
- Vargas-Mena, J.C., Cordero-Schmidt, E., Bento, D.M., Rodriguez-Herrera, B., Medellín, R.A. & Venticinque, E.M. (2018) Diversity of cave bats in the Brazilian tropical dry forest of Rio Grande do Norte state. *Mastozoología Neotropical*, 25(1), 199–212.
- Vargovitsh, R.S. (2009) New cave Arrhopalitidae (Collembola: Symphypleona) from the Crimea (Ukraine). *Zootaxa*, 2047, 1–47.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.2047.1.1>
- Vargovitsh, R.S. (2012) New troglomorphic Arrhopalitidae (Collembola: Symphypleona) from the Western Caucasus. *Zootaxa*, 3174, 1–21.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3174.1.1>
- Vargovitsh, R.S. (2013) Cavernicolous *Arrhopalites abchasicus* sp. nov. (Collembola: Symphypleona: Arrhopalitidae) from the West Caucasus with a key to the world species of the genus. *Zootaxa*, 3666, 16–30.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3666.1.2>
- Winkler, D., Mateos, E., Traser, G., Lakatos, F. & Tóth, V. (2020) New insight into the systematics of European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae) using molecular and morphological data. *Insects*, 11(5), 302.
<https://doi.org/10.3390/insects11050302>
- Womersley, H. (1934) A preliminary account of the Collembola-Arthropleona of Australia, Part II, Superfamily Entomobryoidea. *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 58, 86–138.
- Yoshii, R. (1992) Interim report of the taxonomic researches toward the Collembolan family Cyphoderidae. *Contributions from the Biological Laboratory, Kyoto University*, 28(1), 99–118.
- Zeppelini, D. & Palacios-Vargas, J.G. (1999) A new troglomorphic species of *Arrhopalites* (Collembola: Arrhopalitidae) from Brazil. *Journal of the New York Entomological Society*, 78–81.
- Zeppelini, D., & Brito, R. A. (2014) Two new species of *Pararrhopalites* (Collembola: Symphypleona: Sminthuridae) in Brazil. *Florida Entomologist*, 97(4), 1733–1744.
<https://doi.org/10.1653/024.097.0449>
- Zeppelini, D., Lima, E.C.A., Brito, R.A., Soares, G. A. (2018) A new species of *Pararrhopalites* Bonet & Tellez (Collembola, Symphypleona, Sminthuridae) from iron caves in Brazil. *Neotropical Entomology*, 47, 492–501. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0569-0>
- Zeppelini, D., Brito, R.A., Zampaulo, R. & Lima, E. C. (2020) A new highly dimorphic genus of Sminthuridae (Collembola: Symphypleona) from Brazil. *Zootaxa*, 4729(1), 25–46.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4729.1.2>
- Zeppelini, D., Oliveira, J.V.L., de Lima, E.C.A., Brito, R.A., Ferreira, A.S., Stievano, L. C., Brito, N.P., Oliveira-Neto, M.A. & Lopes, B.C. (2022) Hotspot in ferruginous rock may have serious implications in Brazilian conservation policy. *Scientific Reports*, 12(1), 14871.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-18798-1>
- Zeppelini, D., Queiroz, G.C., Bellini, B.C., Brito, R. A., Oliveira, J.V.L.C., Lopes, B.C.H., Lima, E.C.A., Ferreira, A.S. & Brito, N.P. (2024a) Entomobryidae in *Catálogo*

- Taxonômico da Fauna do Brasil*. PNUD. Available at: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/11972>>. (Accessed 19 January 2024)
- Zeppelini, D., Queiroz, G.C., Bellini, B.C., Brito, R. A., Oliveira, J.V.L.C., Lopes, B.C.H., Lima, E.C.A., Ferreira, A.S. & Brito, N.P. (2024b) Sminthuridae in *Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil*. PNUD. Available from: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/18545> (Accessed 19 January 2024)
- Zhang, F., Bellini, B.C & Soto-Adames, F.N. (2019) New insights into the systematics of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha): first instar chaetotaxy, homology and classification. *Zoological Systematics*, 44(4):249–278.
<https://doi.org/10.11865/zs.201926>
- Zhang, F., Jantarit, S., Nilsai, A., Stevens, M.I., Ding, Y. & Satasook, C. (2018) Species delimitation in the morphologically conserved *Coecobrya* (Collembola: Entomobryidae): A case study integrating morphology and molecular traits to advance current taxonomy. *Zoologica Scripta*, 47(3), 342–356.
<https://doi.org/10.1111/zsc.12279>

3 CONCLUSÕES FINAIS

Os capítulos que compõe esta tese fornecem um estudo integrativo da fauna subterrânea de Collembola na região oeste do Rio Grande do Norte. Individualmente, cada capítulo contribuiu para o avanço do conhecimento sistemático e evolutivo de diferentes grupos, por meio de abordagens integrativas, com dados morfológicos e moleculares e análises filogeográficas. Foram redescritas espécies com base em novos dados morfológicos e genéticos, como *Trogolaphysa zeppelini* comb. nov., cuja posição filogenética foi testada com base em seu mitogenoma completo, representando um marco na compreensão evolutiva do gênero. A aplicação de múltiplos métodos de delimitação de espécies revelou cinco linhagens distintas na Caatinga, cuja separação morfológica ainda é limitada, mas geneticamente bem sustentada. Esta espécie corrobora com dados anteriores sobre a existência de um complexo de espécies crípticas em *Trogolaphysa* distribuídas em outros biomas e regiões geográficas distantes.

Além disso, foram descritas duas novas espécies de Collembola cavernícolas, *Cyphoderus caatinguensis* e *Pararrhopalites iataganii*, ampliando o conhecimento sobre a diversidade da entomofauna subterrânea na região estudada. Estas novas descrições contribuem para futuras políticas de conservação das cavernas potiguaras, ressaltando a urgência de preservar esses habitats frágeis frente às diversas ameaças antrópicas.

Apesar do avanço significativo proporcionado por este trabalho, diversas cavernas da região permanecem inexploradas, especialmente aquelas que não estão inseridas em unidades de conservação. Assim, destaca-se a necessidade de novos inventários e esforços de amostragem sistemática, principalmente em ambientes ainda pouco conhecidos do semiárido brasileiro. Portanto, esta tese representa uma contribuição substancial ao conhecimento da biodiversidade subterrânea do bioma Caatinga e reforça a importância de estudos sobre a biodiversidade de invertebrados cavernícola para regiões calcárias do Rio Grande do Norte, que funcionam como refúgios naturais para uma fauna subterrânea, muitas vezes restrita às cavernas e ainda pouco conhecida.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional do Petróleo, G.N. e B. (2019) Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural. Superintendência de Desenvolvimento e Produção, 1–38.
- Alves, J.J.F. (2016) Geodiversidade e geoturismo no município de Apodi/RN: o caso do lajedo de Soledade. *Revista de Geociências do Nordeste*, 2, 1201–1210.
- Angelim, L.A.D.A. (2006). *Geologia e recursos minerais do estado do Rio Grande do Norte*. CPRM; FAPERN.

Arlé, R. & Guimaraes, A.E. (1979) A new species of the genus *Paronella* Schott, 1893, from Rio de Janeiro (Collembola). *Revista Brasileira de Entomologia*.

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

Bellinger, P.F., Christiansen, K.A. & Janssens, F. (1996–2024) Checklist of the Collembola of the World. Available from: <http://www.collembola.org> (accessed 11 October 2024).

Bellini, B. C., Zhang, F., de Souza, P. G. C., dos Santos-Costa, R. C., Medeiros, G. D. S., & Godeiro, N. N. (2022). The evolution of Collembola higher taxa (Arthropoda, Hexapoda) based on mitogenome data. *Diversity*, 15(1), 7.

Bento, D. M., Ferreira, R. L., Vasconcelos, S., de Lima, J. L. R., Oliveira, G., Silva, T. C., & Lima, S. M. Q. (2024). Before it's too late: priority areas for conservation of cryptic and threatened species of troglobitic arthropods in the Brazilian semiarid. *Biodiversity and Conservation* 33, 1985–2010. DOI: 10.1007/s10531-024-02833-w

Bento, D.D.M., Ferreira, R.L., Prous, X., Souza-Silva, M., Bellini, B.C. & Vasconcellos, A. (2016) Seasonal variations in cave invertebrate communities in the semiarid Caatinga, Brazil. *Journal of Cave and Karst Studies*, 78 (2), 61–71.

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

Bonet, F. & Tellez, C. (1947) Un nuevo genero de Esminturidos (Collembola). *Revista de la Sociedad Mexicana Historia Natural*, 8, 193–203.

Brasil. (1990) Decreto Lei n.º 99.556, de 01 de outubro de 1990. Dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 01 Outubro 1990. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1990-1994/d99556.htm (acessado em 25 de setembro de 2024).

Brasil. (2000) Lei n.º 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o artigo 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 Julho 2000. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm (acessado em 25 setembro 2024).

Brasil. (2008) Decreto n.º 6.640, de 07 de novembro de 2008. Dá nova redação aos arts. 1º, 2º, 3º, 4º e 5º e acrescenta os arts. 5-A e 5-B ao Decreto no 99.556, de 01 de outubro de 1990, que dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 07 Novembro 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/decreto/d6640.htm (acessado em 25 de setembro de 2024).

CANIE/CECAV. (2025) Base de dados do Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE) do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV). Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/cadastro-nacional-de-informacoes-espeleologicas/canie>. Acesso em 09 de setembro de 2025.

Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M. & Satler, J.D. (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22 (17), 4369–4383. <https://doi.org/10.1111/mec.12413>

Cassagnau, P. (1963) Collemboles d'Amérique du Sud, II. Orchesellini, Paronellinae, Cyphoderinae. *Biologie de la Amérique Australe*, 2, 127–148.

CECAV/ICMBio. (2013) IV Curso de Espeleologia e Licenciamento Ambiental. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Caverna. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/IV_Curso_de_Espeleologia_e_Licenciamento_Ambiental.pdf (acessado em 25 setembro 2024).

CECAV/ICMBio. (2019) Cavernas Naturais Subterrâneas. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Caverna. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cecav/cavernas-naturais-subterraneas.html> (acessado em 25 setembro 2024).

Cipola, N.G., Morais, J.W. & Bellini, B.C. (2022) Survey of *Trogolaphysa* Mills (Collembola, Paronellidae) of the Brazilian Amazon, including five new species and the description of the dorsal chaetotaxy of the first instar. *Zootaxa*, 5093 (3), 251–295. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5093.3.1>.

Cruz, J.B., Bento, D.M., Bezerra, F.H.R., Freitas, J.I. & Campos, U.P. (2010) Diagnóstico Espeleológico do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Espeleologia* 1, 1–24.

De Oliveira, P.E., Barreto, A.M.F. & Suguio, K. (1999) Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 152 (3–4), 319–337.

Ferreira, R. L., & Horta, L. C. S. (2001). Natural and human impacts on invertebrate communities in Brazilian caves. *Revista Brasileira de Biologia*, 61, 7-17.

Fišer, C., Robinson, C.T. & Malard, F. (2018) Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology*, 27 (3), 613–635. <https://doi.org/10.1111/mec.14486>

Godeiro, N.N., Ding, Y., Cipola, N.G., Jantarit, S., Bellini, B.C. & Zhang, F. (2023) Phylogenomics and systematics of Entomobryoidea (Collembola): marker design, phylogeny and classification. *Cladistics*.

Handschin, E. (1924) Neue myrmecophile und termitophile Collembolenformen aus Süd-Amerika. *Neue Beiträge zur systematischen Insektenkunde*, 3, 13–28.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S96-S99.

Hogg, I. D., & Hebert, P. D. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 82(5), 749-754.

Hopkin, S.P. (1997) *Biology of the springtails: (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press, Oxford.

Juan, C. & Emerson, B.C. (2010) Evolution underground: Shedding light on the diversification of subterranean insects. *Journal of Biology*, 9, 227. <https://doi.org/10.1186/jbiol227>.

Katz, A. D., Giordano, R., & Soto-Adames, F. N. (2015). Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173(4), 818-840.

Katz, A. D., Taylor, S. J., & Davis, M. A. (2018). At the confluence of vicariance and dispersal: Phylogeography of cavernicolous springtails (Collembola: Arrhopalitidae, Tomoceridae) codistributed across a geologically complex karst landscape in Illinois and Missouri. *Ecology and Evolution*, 8(20), 10306-10325.

Kováč, Ľ., Žurovcová, M., Raschmanová, N., Jureková, N., Papáč, V., & Parimuchová, A. (2023). Troglomorphic adaptations on the northern European frontier: the phylogeny of the cave *Pseudosinella* (Hexapoda, Collembola) in the Western Carpathians. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1169911.

Lukić, M. (2019) Collembola. *Encyclopedia of Caves*, 308–319. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814124-3.00034-0>.

Mari-Mutt, J.A. (1987) Puerto Rican species of Paronellidae (Insecta: Collembola). *Caribbean Journal of Science*, 23, 400–416.

Mateos, E., Winkler, D., Riutort, M. & Álvarez-Presas, M. (2021) New morphological and molecular data reveal an important underestimation of species diversity and indicate evolutionary patterns in European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae). *Invertebrate Systematics*, 35 (5), 471–492. <https://doi.org/10.1071/IS20016>.

Mills, H.B. (1938) Collembola from Yucatan caves. In: *Fauna of the caves of Yucatan. Carnegie Institution of Washington Publication*, 183–190.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). (2014) Portaria nº 43/2014.

MMA (Ministerio do Meio Ambiente). (2018) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I*. ICMBio/MMA, Brasília, DF, 492 pp.

PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção.

Nguyen, M. & Soto-Adames, F.N. (2018) Annotated checklist of Afrotropical *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Hexapoda: Collembola: Paronellidae) and description of a new species from Madagascar. *Zoosystema*, 40 (2), 179–196.

Nicolet, H. (1842) Recherches pour servir à l'Histoire des Podurelles. *Nouveaux Mémoires de la Société helvétique des Sciences naturelles*, 6, 1–88.

Nunes, R.C. & Bellini, B.C. (2018) Three new species of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha) from Brazilian Caatinga-Cerrado transition, with identification keys to Brazilian *Cyphoderus*, *Pseudosinella* and *Trogolaphysa* species. *Zootaxa*, 4420 (1), 71–96.

Palacios-Vargas, J. G. (2002). La distribución geográfica de los Collembola en el mundo subterráneo. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, 36, 1-5.

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

Palacios-Vargas, J.G. & Wilson, J.M. (1990) *Troglobius coprophagus*, a new genus and species of cave Collembola from Madagascar, with notes on its ecology. *International Journal of Speleology*, 19, 67–73. <http://doi.org/10.5038/1827-806X.19.1.6>

Palacios-Vargas, J. G. & Zeppelini, D. (1995). A new species of *Troglobius* (Collembola, Paronellidae) from Brazil. *International Journal of Speleology*, 23(3), 3.

Porpino, K.O., Santos Jr, V., Santos, M.F.C.F. (2007) Lajedo de Soledade, Apodi, RN - Ocorrência peculiar de megafauna fóssil quaternária no nordeste do Brasil. In: Winge, M., Schobbenhaus, C., Souza, C.R.G., Fernandes, A.C.S., Berbert-Born, M., Queiroz, E.T. (Edit.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio127/sitio127.pdf>

Potapov, A.M., Guerra, C.A., van den Hoogen, J. *et al.* (2023) Globally invariant metabolism but density-diversity mismatch in springtails. *Nature Communications*, 14, 674. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36216-6>

Poulson, T.L. & White, W.B. (1969) The cave environment. *Science* 165, 971–981.

Schäffer, C. (1897) Apterygoten. Hamburger Magalhaensische Sammelreise, 1–48.

Soto-Adames, F. N. (2002) Molecular phylogeny of the Puerto Rican *Lepidocyrtus* and *Pseudosinella* (Hexapoda: Collembola), a validation of Yoshii's "color pattern species". *Molecular phylogenetics and evolution*, 25(1), 27-42. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00250-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00250-6)

Soto-Adames, F. N., & Taylor, S. J. (2013). The dorsal chaetotaxy of *Trogolaphysa* (Collembola, Paronellidae), with descriptions of two new species from caves in Belize. *ZooKeys*, (323), 35. DOI: [10.3897/zookeys.323.4950](https://doi.org/10.3897/zookeys.323.4950)

Soto-Adames, F. N., Jordana, R., & Baquero-Martin, E. (2014) Comparative analysis of the dorsal chaetotaxy of *Troglopedetes*, *Trogolaphysa*, and *Campylothorax* supports the synonymization of tribes paronellini and troglopedetini (Collembola: Paronellidae). *Journal of Insect Science*, 14 (1), 278. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu140>

Soto-Adames, F., Daly, K. M., & Wynne, J. J. (2024). Synopsis of Neotropical *Trogolaphysa* Mills, 1938 (Collembola: Paronellidae) with Reduced Eye Number, and Description of Two New Troglobiontic Species from Belize. *Taxonomy*, 4(1), 199–236.

Souza, P. G. C. (2021) Revisão de *Trogolaphysa* Mills, (Collembola, Entomobryomorpha, Paronellidae), com a descrição de novas espécies de cavernas, domínio caatinga, Brasil, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/32691>

Trajano, E., & Bessi, R. (2017) A classificação Schiner-Racovitza dos organismos subterrâneos: uma análise crítica, dificuldades para aplicação e implicações para conservação. *Espeleo-Tema*, 28, 87-102.

Utida *et al.* (2020). Climate changes in Northeastern Brazil from deglacial to Meghalayan periods and related environmental impacts. *Quaternary Science Reviews*, 250, 106655.

Winkler, D., Mateos, E., Traser, G., Lakatos, F., & Tóth, V. (2020). New insight into the systematics of European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae) using molecular and morphological data. *Insects*, 11(5), 302.

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

Yoshii, R. (1988) Paronellid Collembola from caves of Central and South America collected by P. Strinati. *Revue Suisse de Zoologie*, 95, 449–459. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.82022>

Yosii R (1956) Höhlencollembohlen Japans II Japanese. *Journal of Zoology*, 11, 609–627.

Yu, D., Qin, C., Ding, Y., Hu, F., Zhang, F., & Liu, M. (2018). Revealing species diversity of *Tomocerus ocreatus* complex (Collembola: Tomoceridae): integrative species delimitation and evaluation of taxonomic characters. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 76(1), 147-172.

Zeppelini, D., Oliveira, J. V. L., de Lima, E. C. A., Brito, R. A., Ferreira, A. S., Stievano, L. C., Brito, N. P., Oliveira-Neto, M. A. & Lopes, B. C. (2022). Hotspot in ferruginous rock may have serious implications in Brazilian conservation policy. *Scientific Reports*, 12(1), 14871.