

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA
LABORATÓRIO DE ESTUDOS SUBTERRÂNEOS

JÉSSICA SCAGLIONE GALLO

**Diferenciação de diplópodes epígeos e hipógeos do Neotrópico: uma abordagem
morfológica, molecular e ecológica**

Ribeirão Preto

2023

JÉSSICA SCAGLIONE GALLO

**Diferenciação de diplópodes epígeos e hipógeos do Neotrópico: uma abordagem
morfológica, molecular e ecológica**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elina Bichuette

Ribeirão Preto

2023

RESUMO

Gallo, J.S. **Diferenciação de diplópodes epígeos e hipógeos do Neotrópico: uma abordagem morfológica, molecular e ecológica.** Tese – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2023, 180 folhas.

Os diplópodes *Pseudonannolene* são frequentemente encontrados no ambiente subterrâneo, possuindo espécies troglóbias, troglófilas e epígeas, o que possibilita estudos comparativos morfológicos, molecular e ecológicos de cunho evolutivo. A presente tese teve como objetivo realizar a análise morfológica, anatômica, molecular e comportamental da espécie *P. imbiensis*, a qual é conhecida há mais de 25 anos e seu *status* de troglóbio ainda gera dúvidas. Para tal, elencamos as seguintes perguntas: A genética molecular corrobora a classificação taxonômica embasada pela morfologia? Há diferenças em outros caracteres morfológicos e anatômicos, além dos troglomorfismos clássicos, que possam indicar diferenciação em relação ao isolamento subterrâneo? Há diferenças comportamentais (ciclo circadiano) nos diplópodes troglóbios em resposta ao isolamento subterrâneo? A partir do uso da morfometria geométrica combinado com análise molecular Citocromo Oxidase I (COI) do genoma mitocondrial inferimos que *P. imbiensis* é uma espécie críptica com populações em diferenciação, apresentando morfotipos distintos, morfotipo “Lapa São Bernardo” e Morfotipo “Bacia do Rio São Vicente”, além da espécie nominal já conhecida. Ainda, identificamos uma possível espécie nova troglóbia, sem troglomorfismos morfológicos aparentes, na Lapa da Terra Ronca I e Sistema da Terra Ronca II - Malhada. O Nano CT-Scan se mostrou eficaz para a detecção de troglomorfismos anatômicos com a solução de contraste de Ácido fosfomolibdico (PMA) pigmentando estruturas internas não esclerotizadas. Não foi constatado a redução do lobo óptico em *P. imbiensis* como em outros artrópodes subterrâneos, o que pode representar um caráter plesiomórfico para *Pseudonannole*. Isto porque há uma grande variação no número de omatídeos na família Pseudonannolenidae e há espécies epígeas com omatídeos ausentes. A atividade locomotora de *P. imbiensis* morfotipo “Bacia do Rio São Vicente” é caracterizada por períodos de forrageio intercalado com *grooming* e evidente redução do repouso, apresentando espécimes com ritmos ultradianos em torno de 8-11h de duração. A redução do repouso e ritmo circadiano podem ser considerados troglomorfismos para o grupo. Além disso, a regressão do ritmo circadiano e a ausência de ritmicidade já foram registradas em outras espécies

troglóbias de diferentes grupos taxonômicos, podendo ser considerada uma convergência evolutiva diante ao isolamento subterrâneo. As populações de *P. imbiensis* estão ameaçadas pelo turismo sem manejo e pela contaminação das nascentes dos rios, que não estão no perímetro do Parque Estadual de Terra Ronca. Além disso o complexo *P. imbiensis* está ameaçada de extinção na categoria Em Perigo (EN). Tal fato, associado ao seu status de troglóbia e críptica, indicam a urgente necessidade de ações efetivas de proteção, como monitoramento, delimitação de áreas intangíveis nas cavidades e divulgação científica para sensibilização da sociedade.

Palavras – Chave: Caverna. Diplopoda. Espécie críptica. Morfometria Geométrica. Nano CT-Scan, Ritmo circadiano. Troglomorfismos.

ABSTRACT

Gallo, J.S. **Differentiation of epigean and hypogean diplopods in the Neotropics: a morphological, molecular and ecological approach**” Tese – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2023, 180 folhas.

Pseudonannole millipedes are often found in subterranean environments with troglobitic, troglophilic, and epigean species, allowing comparative morphological and ecological evolutionary studies. This study aimed to carry out a morphological, anatomical, molecular, and behavioral analysis of *P. imbiensis*, a species known for more than 25 years whose status as a troglobitic was still in doubt. To this end, we asked the following questions: Does molecular genetics support the taxonomic classification based on morphology? Are there differences in other morphological and anatomical characters, in addition to the classical troglomorphisms, which could be indicative of a differentiation related to the subterranean isolation? Are there behavioral differences (circadian cycle) in troglobitic diplopods in response to subterranean isolation? Using geometric morphometrics combined with molecular analysis of the Cytochrome Oxidase I (COI) of the mitochondrial genome, we concluded that *P. imbiensis* is a cryptic species with populations in differentiation, presenting different morphotypes: the "Lapa São Bernardo" morphotype and the "Bacia do Rio São Vicente" morphotype, in addition to the already known nominal species *P. imbiensis stricto sensu*. We also identified a possible new troglobitic species without obvious morphological troglomorphisms in Lapa da Terra Ronca I and Sistema da Terra Ronca II - Malhada. Nano-CT-Scan proved effective in detecting anatomical troglomorphisms with the phosphomolybdic acid (PMA) contrast solution, which pigmented non-sclerotized internal structures. There was no reduction of the optic lobe in *P. imbiensis* as in other subterranean arthropods, which is a plesiomorphic feature for *Pseudonannole*. This is because there is great variation in the number of ommatidia in the family Pseudonannolenidae and there are epigean species with absent ommatidia. The locomotor activity of *P. imbiensis* morphotype "São Vicente River Basin" is characterized by periods of foraging interspersed with grooming and a marked reduction in rest periods, with specimens showing ultradian rhythms of around 8-11 hours. The reduction in resting time and the circadian rhythm can be considered troglomorphic for the group. In addition, the regression of the circadian rhythm and the absence of rhythmicity have already been recorded in other troglobitic species from different taxonomic groups and could be considered an

evolutionary convergence in the face of subterranean isolation. Populations of *P. imbiensis* complex are threatened by uncontrolled tourism and contamination of river sources outside the boundaries of Terra Ronca State Park. In addition, this species is in danger of extinction in the Endangered (EN) category. This fact, together with its troglobitic and cryptic status, indicates the urgent need for effective conservation measures, such as monitoring, demarcation of intangible areas in caves, and scientific dissemination to raise awareness in society.

Keywords: Caves. Cryptic species. Diplopoda. Geometric morphometrics. Nano CT-Scan. Circadian rhythm. Troglomorphisms.