



RAYSSA KAROLINA FERREIRA BORGES

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE
UMA ESPÉCIE DE ANFÍPODE TROGLÓBIO DE
PRESIDENTE OLEGÁRIO – MG**

**LAVRAS – MG
2020**

RAYSSA KAROLINA FERREIRA BORGES

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE DE
ANFÍPODE TROGLÓBIO DE PRESIDENTE OLEGÁRIO – MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Ecossistemas Fragmentados e Agroecossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Prof(a). Dr(a). Alessandra Angélica de Pádua Bueno

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Borges, Rayssa Karolina Ferreira.

Variabilidade fenotípica entre populações de uma espécie de anfípode troglóbico de Presidente Olegário - MG / Rayssa Karolina Ferreira Borges. - 2020.

48 p.

Orientador(a): Alessandra Angélica de Pádua Bueno.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Hyalella. 2. morfologia. 3. ambiente subterrâneo. I. Bueno, Alessandra Angélica de Pádua. II. Título.

RAYSSA KAROLINA FERREIRA BORGES

VARIABILIDADE FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE DE ANFÍPODE TROGLÓBIO DE PRESIDENTE OLEGÁRIO – MG

PHENOTYPIC VARIABILITY BETWEEN POPULATIONS OF A SPECIES OF TROGLOBITIC AMPHIPOD OF PRESIDENTE OLÉGÁRIO - MG

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Ecossistemas Fragmentados e Agroecossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de janeiro de 2020
Dr. Giovanna Monticelli Cardoso UFLA
Dr. Maria Elina Bichuette UFSCar

Prof(a). Dr(a) Alessandra Angélica de Pádua Bueno
Orientador(a)

**LAVRAS – MG
2020**

*Á memoria da minha avó Ataisia Mariano,
Pelo exemplo de amor, carinho e perseverança
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente queria agradecer a Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada pela oportunidade e por todo conhecimento fornecido ao longo destes dois anos de mestrado. A todos os professores, pós-doutorandos, doutorandos, a Ellen e colegas de mestrado, o meu mais sincero obrigado.

Agradeço imensamente a minha orientadora Alessandra. Estar sob sua orientação desde a graduação me permite dizer que ao longo destes anos ela se tornou, além de amiga, a minha maior fonte de inspiração para continuar nessa batalha difícil que tem sido a ciência no Brasil. Obrigada por sempre me mostrar que trabalhar com ciência é tão importante e necessário diante desse obscurantismo que tem crescido mais e mais na sociedade. Obrigada por ter confiado em mim mais uma vez, por me mostrar o mundo das *Hyaella* e o submundo delas (leia-se cavernas) e que elas podem sempre ficar mais interessantes do que elas já são.

À professora Maria Elina, a Lina! Por fornecer todo o material deste trabalho, por topar ir coletar com a gente e ensinar de forma tão bonita um pouquinho de Espeleologia. E por deixar minha primeira experiência de entrar em uma caverna tão interessante e divertida. Também agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Estudos Subterrâneos (LES-BIO) da UFSCar, em especial a Tamires, por me recepcionar tão bem e serem tão gentis no momento que estivemos juntos, tanto dentro como fora do laboratório.

Às meninas, e menino, do laboratório de Carcinologia! Pelos momentos divertidos, apoio e companhia e em especial para duas integrantes. Primeiro a Lorena, que se tornou uma amiga tão importante para mim! Por sempre estar junto nessa tarefa árdua que foi o mestrado, deixando tudo mais leve. E “Miga”, espero que sejamos “LoreRay” durante muito tempo! O segundo é para Ludmila, que em toda sua doçura sempre foi um apoio importante.

Aos meus amigos maravilhosos, em especial o Dedé e a Joyce, por sempre estarem do meu lado, não importa qual momento fosse. Por acreditarem em mim, me fazerem ver que sempre existe uma saída e que nada está perdido. E ao Matheus, que mesmo estando distante fisicamente, fez-se presente sempre me apoiando e incentivando. Amo vocês!

Agradeço a um presente inusitado que o mestrado pode me proporcionar, que foi a entrada do João Pedro na minha vida! Mesmo estando a tão pouco nela, foi uma pessoa muito importante nessa fase final. Obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma e me incentivar como ninguém jamais fez.

E por fim o meu maior agradecimento vai para os meus pais e irmão, sem eles não teria feito esse mestrado. Foram eles que aceitaram “investir” em mim mais esses dois anos de curso, só para eu ter a chance de realizar o sonho de ser mestre. Se não fossem eles dizendo “Rayssa, você vai sim”, eu não estaria entregando esta pesquisa. Obrigada por acreditarem em mim e na minha capacidade mais uma vez. Amo vocês.

RESUMO

A pressão direcional causada através das características principais do ambiente subterrâneo, como a ausência de luz e oligotrofia, sempre foram as premissas para as modificações encontradas nos organismos especializados nestes locais. No entanto, novos estudos vêm demonstrando que os habitats ocorrem nestes ambientes, como poças e rios por exemplo, também podem ser modeladores destas diferenças morfológicas encontradas. Alguns organismos são tipicamente encontrados em ambientes hipógeos, dentre eles alguns crustáceos anfípodes. No Brasil, algumas espécies já foram descritas para este ambiente e entre elas apenas uma ocorre em mais de uma cavidade e em habitats diferentes, a *Hyaella veredae*. A presença destes organismos em locais e habitats distintos é uma oportunidade para avaliar quais são as pressões exercidas sobre as morfologias desses crustáceos troglóbios. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se as morfologias encontradas para *Hyaella veredae* podem também ser associadas ao habitat e não somente ao ambiente subterrâneo, nas quatro cavernas onde ela se distribui. Os organismos foram coletados nos anos de 2013, 2014 e 2019 em cavernas de Presidente Olegário – MG e os habitats amostrados foram categorizados em lóticos e lênticos. Os crustáceos foram levados ao laboratório para avaliação dos traços troglomórficos, relacionados aos olhos, antenas e pereiópodos (IV ao VII) para a comparação. As estruturas foram fotografadas e medidas e a razão entre elas e o tamanho corporal, ou cabeça como no caso dos olhos, foram utilizadas para as análises estatísticas. Os dados obtidos foram comparados entre habitats pela análise de Mann-Whitney e submetidos a uma PCA para ver como estes dados se comportavam em relação aos ambientes. Os organismos se diferiram significativamente em relação ao habitat, as diferenças ocorreram no tamanho dos olhos ($p < 0,001$); antenas 1 e 2 ($p = 0,005$; $p < 0,001$, respectivamente) e os pereiópodos 4, 5 e 7 ($p = 0,019$; $p = 0,033$; $0,009$, respectivamente). As maiores antenas, maiores olhos e menores pereiópodos se associaram a ambientes lóticos, enquanto o inverso relacionou-se ao lêntico. As duas PCA mostraram que organismos em habitats semelhantes são morfologicamente semelhantes do que os de habitats distintos. Houve uma sobreposição das morfologias dos organismos, que pode ser associado aos apêndices que não se diferiram entre habitats. Os resultados obtidos evidenciam que as diferenças morfológicas podem ser associadas aos habitats, possivelmente devido ao fluxo de água, que pode ser danoso as estruturas promovendo a diminuição das mesmas. O alongamento de estruturas pode estar associado a percepção de estímulos no ambiente. Já a diferença entre o tamanho dos olhos pode estar associada ao gradiente de luz no ambiente de caverna, já que os maiores olhos foram encontrados em organismos que estavam em zonas onde ocorre luz indireta. A variação fenotípica da espécie *H. veredae* pode ser decorrente da plasticidade desta espécie de anfípode, já que ela se mostrou capaz de se adaptar a diversos ambientes cavernícolas.

Palavras – Chave: *Hyaella*. Morfologia. Ambiente subterrâneo.

ABSTRACT

Directional pressure caused by the main features of the underground environment, such as the absence of light and oligotrophy, have always been the premises for the modification found in specialized organisms at these sites. However, new research show that habitats within the cave environment, such as puddles and rivers, can also act as drivers for the existing morphological differences. Some organisms are typically found in hypogean environments, including some amphipod crustaceans. Among the few amphipod species listed to Brazilian caves, only one is known to occur in more than one cave and in different habitats, *Hyaella veredae*, which enables the opportunity to evaluate the pressures on the morphology of this species. The objective of this research was to assess if the morphologies observed on the troglobite *Hyaella veredae* can be associated to habitat variation, and not only to the hypogean environment *per se*, considering the four caves where it is distributed. The organisms were collected in 2013, 2014 and 2019 at Presidente Olegário municipality, Minas Gerais state, and the habitats were characterized as lentic or lotic. The crustaceans were taken to the laboratory to evaluate the troglomorphic traits related to the eyes, antenna and pereopods (IV to VII). The structures were photographed and measured. The ratios between head length and eye size, and the ratios between body length and the other structures sizes were used on statistical analyses. We used Mann-Whitney to compare morphological and habitat data, followed by PCA to visually observe the connections. The organisms differed significantly in relation to the habitat, mainly on the eyes ($P < 0.001$); antenna 1 ($p = 0.005$); antenna 2 ($p < 0.001$); and pereopods IV, V and VII ($p = 0,019$; $p = 0,033$; $0,009$, respectively). The longer antenna, biggest eyes and shorter pereopods were associated to lotic environments, while the opposite was related to lentic environments. The PCA showed that similar habitats produced morphologically similar organisms. There was a morphological overlap, probably associated to the appendices that did not differentiate between habitats. Our results indicate that morphological differences could be associated to habitats; structure reduction could be related to the waterflow that can damage the appendages; and structure elongation is related to perception of the stimuli on the environment. The eye size differences should be associated to the light gradient inside the cave, as the organisms bearing bigger eyes were found at the twilight zone. The phenotypical variation in *Hyaella veredae* can derive from this species plasticity, since it showed some ability to adapt to the variable cave environments.

Keywords: *Hyaella*. Morphology. Hypogean environment.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
SEGUNDA PARTE.....	16
ARTIGO - VARIABILIDADE FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE DE ANFÍPODE TROGLÓBIO DE PRESIDENTE OLEGÁRIO - MG.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2. 1 A área de estudos.....	20
2. 2 A amostragem da <i>Hyalella veredae</i>	26
2. 2. 1 A coleta dos dados	27
2. 2. 2 Confirmação da espécie.....	30
2. 3 Análises dos dados.....	30
2. 3. 1 Análises estatísticas dos traços troglomórficos.....	31
3 RESULTADOS	31
3. 1 Os organismos coletados	31
3. 2 Traços troglomórficos	34
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Ambiente subterrâneo, em geral, é considerado extremo devido às suas características, de alta umidade, temperatura constante, oligotrofia e ausência de luz (PIPAN & CULVER, 2012; TRAJANO & BICHUETTE, 2006; BISWAS, 2010; LEE *et al.*, 2012). Tais características ambientais exercem uma forte pressão direcional sobre os organismos colonizadores, promovendo uma seleção de caracteres morfológicos e fisiológicos com melhor adaptabilidade a essas condições (HOFFMANN & PARSONS, 1997; STERN, 2013).

Os organismos que podem apresentar modificações são considerados exclusivos a este ambiente (TRAJANO & BICHUETTE, 2006). As espécies que possuem estas modificações, podem tanto terem sua ocorrência restrita ao ambiente subterrâneo, sendo chamadas assim de troglóbias, como podem ser troglófilas, onde são capazes de completar seu ciclo de vida tanto no meio epígeo quanto o hipógeo, ocorrendo em ambos ambientes. (TRAJANO & BICHUETTE, 2006; HOWARTH, 2018). Tais modificações, ou troglomorfmismos, são um *trade-off* para determinar a permanência e sucesso adaptativo da espécie as características bióticas e abióticas dos habitats subterrâneos (DICKSON, 1977; TRONTELJ *et al.*, 2012; FIŠER *et al.*, 2013).

As características ambientais globais do meio hipógeo, não são as únicas que exercem influência sobre os organismos. Pequenas diferenças podem promover essa diversidade morfológica, partindo do pressuposto de nichos (FIŠER *et al.*, 2012). Desta forma, pode-se inferir que existem diferentes níveis de modificações troglomórficas, de acordo com as características de cada habitat existente em uma caverna (DELIC' *et al.*, 2016).

O ambiente cavernícola possui tanto uma zonação dada pela sua distância do ambiente externo, como uma estratificação no habitat terrestre e também no aquático (TRAJANO & BICHUETTE, 2006). Por exemplo, existe um zoneamento associado ao gradiente de luz, e flutuações da temperatura em relação a distância da entrada até o interior da caverna. Assim como a diferença de sedimentos no ambiente terrestre, e a separação em habitats lóticos e lântico no meio ambiente aquático, promovem a estratificação (TRAJANO & BICHUETTE, 2006). Essa pluralidade de habitats pode ser um dos modeladores da diversidade morfológica dos organismos presentes nestes ambientes

A chave da questão pode estar na plasticidade fenotípica da espécie, servindo de ferramenta para o estabelecimento e persistência dos organismos em diversos habitats subterrâneos (ROMERO & GREEN, 2005; GHALAMBOR *et al.*, 2007). Plasticidade tem como definição a capacidade que um genótipo tem de produzir diferentes fenótipos quando

exposto a condições ambientais diferentes durante sua ontogênese (PIGLIUCCI, 2005). A partir deste conceito, é possível supor que a plasticidade seja um dos fatores que promove a variabilidade fenotípica entre populações/espécies no meio subterrâneo (ROMERO & GREEN, 2005; ROMERO, 2011).

Os crustáceos da ordem Amphipoda são constantemente encontrados no ambiente subterrâneo (VÄINÖLÄ *et al.*, 2008). Pesquisas direcionadas à sua diversidade morfológica evidenciam a grande variabilidade fenotípica dentro da ordem (WELLBORN & COTHRAN, 2004; JOURDAN *et al.*, 2019), fato gerado pela diversidade ecológica destes organismos (FIŠER *et al.*, 2018).

Devido a essa plasticidade morfológica, anfípodes são frequentemente usados como modelos de estudos para verificar os processos de evolução, diversidade fenotípica e adaptação ao ambiente hipógeo, como foi demonstrado para os gêneros *Niphargus* Schiöde, 1849, *Gammarus* Fabricius, 1775 e *Stygobromus* Cope, 1872 (CULVER *et al.*, 2010; FIŠER, 2019, FONG, 2019). Tais resultados permitem expandir as pesquisas para outros gêneros pouco estudados, como *Hyaella* Smith, 1874.

No Brasil, das 28 espécies do gênero *Hyaella* já descritas, apenas sete espécies apresentam troglomorfismos, sendo elas: *Hyaella caeca*, Pereira, 1989, a primeira descrita para este tipo de ambiente; *Hyaella spelaea* Bueno & Cardoso, 2011; *Hyaella formosa*, Cardoso & Araujo, 2014; *Hyaella imbya* Rodrigues e Bueno, 2012; *Hyaella epikarstica* Rodrigues, Bueno & Ferreira, 2014; *Hyaella veredae* Cardoso & Bueno, 2014, e *Hyaella trogloufugia* Bastos-Pereira, Oliveira & Ferreira 2018, sendo que esta última, apesar de apresentar caracteres típicos de espécies cavernícolas, ocorre em um ambiente epígeo (RODRIGUES *et al.*, 2017; STRECK *et al.*, 2017; SEREJO & SIQUEIRA, 2018; BASTOS-PEREIRA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2018) e a *H. imbya* que não ocorre em cavernas mas em outro tipo de ambiente subterrâneo, o hipotelminorrêico (RODRIGUES; BUENO; FERREIRA, 2012). Dentre as *Hyaella* citadas anteriormente, apenas *H. veredae* possui mais de uma população por caverna, fato conhecido nos últimos anos a partir de coletas feitas em várias cavernas próximas à localidade tipo desta espécie, pelos pesquisadores do Laboratório de Estudos Subterrâneos (LES-BIO) da UFSCar.

Os trabalhos de taxonomia com invertebrados cavernícolas brasileiros vêm revelando, ao passar dos anos, uma diversidade nova e única de espécies de anfípodes troglóbios e que possivelmente ainda tem a ser explorada. No entanto, ainda existe uma lacuna acerca da ecologia e evolução destas espécies nestes tipos de ambiente. Essa lacuna de conhecimento

deve ser preenchida e uma das maneiras, é através de estudos da relação entre morfologia destes organismos com o ambiente.

Pesquisas que envolvam estudos ecológicos deste tema podem contribuir para o conhecimento não só da espécie, como do gênero, assim como para a preservação e conservação desses organismos. Portanto esta dissertação tem por finalidade estudar a relação entre a morfologia de uma espécie de anfípode troglóbio, a *Hyaella veredae* e seu ambiente. A espécie ocorre em Presidente Olegário – MG, habitando cavernas distintas. Esta pesquisa é inédita sobre a ecologia de uma espécie de *Hyaella* cavernícola no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISWAS, J. Kotumsar Cave biodiversity: a review of cavernicoles and their troglotic traits. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 1, p. 275, 2010.

CULVER, D. C. et al. Morphological differences among eyeless amphipods in the genus *Stygobromus* dwelling in different subterranean habitats. **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 1, p. 68-74, 2010.

DELIĆ, T. et al. Biotic and abiotic determinants of appendage length evolution in a cave amphipod. **Journal of Zoology**, v. 299, n. 1, p. 42-50, 2016.

DICKSON, G. W. Behavioral adaptation of the troglotic amphipod crustacean *Crangonyx antennatus* to stream habitats. **Hydrobiologia**, v. 56, n. 1, p. 17-20, 1977.

FIŠER, C.; BLEJEC, A.; TRONTELJ, P. Niche-based mechanisms operating within extreme habitats: a case study of subterranean amphipod communities. **Biology Letters**, v. 8, n. 4, p. 578-581, 2012.

FIŠER, C.; ROBINSON, C. T.; MALARD, F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 3, p. 613-635, 2018.

FIŠER, C. *Niphargus*—A model system for evolution and ecology. In: **Encyclopedia of caves**. Academic Press, p. 746-755, 2019

FIŠER, C.; ZAGMAJSTER, M.; ZAKŠEK, V. Coevolution of life history traits and morphology in female subterranean amphipods. **Oikos**, v. 122, n. 5, p. 770-778, 2013.

- FONG, D. W. *Gammarus minus*: a model system for the study of adaptation to the cave environment. In: **Encyclopedia of caves**. Academic Press, p. 451-458, 2019.
- GALLÃO, J. E.; BICHUETTE, M. E. Brazilian obligatory subterranean fauna and threats to the hypogean environment. **ZooKeys**, n. 746, p. 1, 2018.
- GHALAMBOR, C. K. et al. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. **Functional ecology**, v. 21, n. 3, p. 394-407, 2007.
- HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. **Extreme environmental change and evolution**. Cambridge University Press, 1997.
- HOWARTH, F. G.; MOLDOVAN, O. T. The ecological classification of cave animals and their adaptations. In: **Cave Ecology**. Springer, Cham, p. 41-67, 2018.
- JOURDAN, J. et al. Small-scale phenotypic differentiation along complex stream gradients in a non-native amphipod. **Frontiers in zoology**, v. 16, n. 1, p. 29, 2019.
- LEE, N. M. et al. 16 Caves and Karst Environments. **Life at extremes: environments, organisms, and strategies for survival.**, v. 1, p. 320, 2012.
- PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 9, p. 481-486, 2005.
- PIPAN, T.; CULVER, D. C. Convergence and divergence in the subterranean real: a reassessment. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 107, p. 1-14, 2012.
- RODRIGUES, S.; BUENO, A. A. P.; FERREIRA, Rodrigo L. The first hypothelminorheic Crustacea (Amphipoda, Dogielinotidae, *Hyaella*) from South America. **ZooKeys**, v. 236, p. 65, 2012.
- RODRIGUES, S. G. et al. A new species of *Hyaella*(Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Itatiaia National Park, Brazil: an epigean freshwater amphipod with troglotrophic traits at 2,200 meters of altitude. **Zootaxa**, v. 4344, n. 1, p. 147-159, 2017.

SEREJO, C. S.; SIQUEIRA, S. G. L. Catalogue of the Order Amphipoda from Brazil (Crustacea, Peracarida): Suborders Amphilochidea, Senticaudata and Order Ingolfiellida. **Zootaxa**, v. 4431, n. 1, p. 1-139, 2018.

ROMERO, A.; GREEN, S. M. The end of regressive evolution: examining and interpreting the evidence from cave fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 1, p. 3-32, 2005.

ROMERO, A. The Evolution of Cave Life: New concepts are challenging conventional ideas about life underground. **American Scientist**, v. 99, n. 2, p. 144-151, 2011.

STERN, D. L. The genetic causes of convergent evolution. **Nature Reviews Genetics**. v. 14, n. 11, p. 751, 2013.

STRECK, M. T. et al. Two new species of Hyalella (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Zootaxa**, v. 4337, n. 2, p. 263-278.2017.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. *Biologia subterrânea: introdução*. 2006.

TRONTELJ, P.; BLEJEC, A.; FIŠER, C. Ecomorphological convergence of cave communities. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 66, n. 12, p. 3852-3865, 2012.

VÄINÖLÄ, R. et al. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. In: **Freshwater animal diversity assessment**. Springer, Dordrecht, p. 241-255, 2007.

WELLBORN, G. A.; COTHRAN, R. D. Phenotypic similarity and differentiation among sympatric cryptic species in a freshwater amphipod species complex. **Freshwater Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-13, 2004.

SEGUNDA PARTE
Artigo

ARTIGO**Variabilidade fenotípica entre populações de uma espécie de anfípode troglóbio de
Presidente Olegário - MG**

Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022 (ABNT, 2003a).

1 INTRODUÇÃO

A capacidade que um genótipo tem de produzir múltiplos fenótipos quando exposto a diferentes condições ambientais é o centro do conceito de Plasticidade Fenotípica (PIGLIUCCI, 2005). Partindo deste pressuposto, a plasticidade seria uma maneira de promover a variedade fenotípica intraespecífica em diferentes ambientes (MOHADASI, 2013; METRI *et al.*, 2016).

É amplamente aceito que habitat subterrâneo exerce forte pressão direcional sobre caracteres morfológicos (HOFFMANN & PARSONS, 1997). Consequência das poucas, porém extremas, variáveis que compõem este habitat (PIPAN & CULVER, 2012). Estas características conferem potencial para ser um grande laboratório para compreender padrões ecológicos e evolutivos (RIESCH *et al.*, 2009). A pressão de seleção sofrida pelos organismos nestes ambientes pode influenciar, na capacidade de se estabelecer, adaptar e permanecer em um ambiente tão distinto quanto o hipógeo (CULVER & PIPAN, 2010).

A chance que o organismo tem de sobreviver a um ambiente novo estaria relacionada à sua plasticidade quando exposto a condições tão atípicas quanto as do ambiente subterrâneo (ROMERO & GREEN, 2005; FUSCO & MINELLI, 2010). Sendo assim, a plasticidade fenotípica exerce um grande papel evolutivo nestes ambientes, tornando-se a responsável pelos diferentes padrões morfológicos e fisiológicos encontrados em habitats hipógeos (ROMERO & GREEN, 2005; ROMERO, 2011).

É comumente discutido que as pressões de seleção exercidas pelo ambiente hipógeo vem de suas características principais, que são a ausência de luz, temperatura constante e alta umidade, o que pode passar uma ideia de homogeneidade (TRAJANO & BICHUETTE, 2006; BISWAS, 2010; FIŠER *et al.*, 2013; CULVER & PIPAN, 2019). Porém, o ambiente hipógeo é heterogêneo devido à diferenciação em habitat através do gradiente de luz, substratos, e, no caso dos ambientes aquáticos, a presença de habitat lóticos e lênticos e a presença de diversos horizontes, por exemplo (TRAJANO & BICHUETTE, 2006; CULVER & PIPAN, 2019).

Estudos recentes têm demonstrado que os habitats dentro de uma caverna têm seu papel de influência sobre a morfologia dos organismos, como sugere a teoria de nicho (FIŠER *et al.*, 2012). Considerar que a evolução de caracteres morfológicos pode estar relacionada, também, às características do habitat e não apenas às propriedades exclusivas do ambiente subterrâneo, é algo que merece atenção (TRONTELJ *et al.*, 2012; FIŠER, 2019; DELIĆ *et al.*, 2016).

As especificidades do habitat somada às características globais subterrâneas podem exercer influência direta sobre a diversidade morfológica, gerando modificações troglomórficas distintas, ou seja, variabilidade fenotípica em locais diferentes (TRONTELJ *et al.*, 2012; DELIĆ *et al.*, 2016). As variáveis tanto bióticas como abióticas que compõem um habitat, auxiliam na seleção direcional (TRONTELJ *et al.*, 2012).

Mais quais são esses caracteres morfológicos? São o que chamamos de troglomorfismos. Os mais comuns são a despigmentação do tegumento, redução ou ausência dos olhos e alongamento de apêndices (HOWARTH & MOLDOVAN, 2018). As modificações como à regressão e/ou desenvolvimento dos caracteres estão associadas a uma compensação sensorial às condições limitantes do habitat, como é o caso do recurso alimentar (TRAJANO & BICHUETTE, 2006).

O alongamento de estruturas, como por exemplo as antenas, permite o aumento do número de receptores que têm como função a percepção do ambiente e o encontro de alimento (CULVER *et al.*, 2010; TRONTELJ *et al.*, 2012; HOWARTH & MOLDOVAN, 2018). Porém, podem existir diferentes graus de diferenciação troglomórfica, com uma grande variabilidade fenotípica em resposta aos fatores ecológicos (TRONTELJ *et al.*, 2012; DELIĆ *et al.*, 2016; FIŠER, 2019).

Dentre os diversos animais que colonizam os habitats subterrâneos, encontram-se os anfípodes, ordem em que 48% destes organismos são exclusivos de águas subterrâneas (VÄINÖLÄ *et al.*, 2007). Estes pequenos crustáceos são capazes de habitar os mais diversos ambientes aquáticos, como rios, lagos e poças (VÄINÖLÄ *et al.*, 2007). Por estarem presentes em ambientes tão diversos e terem um vasto hábito alimentar, eles são considerados importantes chaves para compreender modificações morfológicas influenciadas pelo ambiente (VÄINÖLÄ *et al.*, 2007; FIŠER, *et al.*, 2018).

As variações intraespecíficas e interespecíficas relacionadas às condições ambientais já foram constatadas tanto para organismos hipógeos quanto epígeos para a ordem Amphipoda. As principais modificações estão relacionadas a alteração do tamanho corporal, dos apêndices locomotores e sensoriais como as antenas e o pereiópodos (STRONG, 1972; DICKSSON, 1977; FONG, 1989; WELLBORN, 1994).

Um dos gêneros de anfípodes encontrados no Brasil está o gênero *Hyaella*. Das oito espécies hipógeas descritas, sete apresentam algum troglomorfismo (GALLÃO & BICHUETTE, 2018; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2012). As espécies hipógeas são encontrados em diversos habitats dentro das cavernas, como lagos, riachos e represas de travertino (RODRIGUES *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2014).

Dentre os Amphipoda hipógeos brasileiros conhecidos, apenas uma espécie, a *Hyaella veredae* Cardoso & Bueno, 2014, ocorre em mais de uma cavidade, o que foi descoberto a partir de coletas feitas em cavernas próximas à localidade tipo desta espécie, pelos pesquisadores do Laboratório de Estudos Subterrâneos (LES-BIO) da UFSCar. As populações não só ocorrem em cavernas com características diferentes, como também em habitats diferentes. A espécie é considerada troglóbia e apresenta modificações troglomórficas típicas, como por exemplo a ausência ou redução dos olhos (CARDOSO *et al.*, 2014). Devido a estas características morfológicas e de seu habitat de ocorrência, ela se torna modelo interessante de ser pesquisado em relação à adaptabilidade a diferentes ambientes subterrâneos.

Portanto a ampla distribuição desta espécie brasileira permite avaliar como diferentes populações de anfípodes de uma mesma espécie subterrânea reagiram ao ser expostas a distintos habitats hipógeos, e se ao serem expostas a pressões semelhantes em cavernas diferentes apresentaram morfologias semelhantes. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se as morfologias encontradas para a espécie *Hyaella veredae* podem estar associadas ao habitat e não somente ao ambiente subterrâneo, para as quatro cavernas onde ela se distribui.

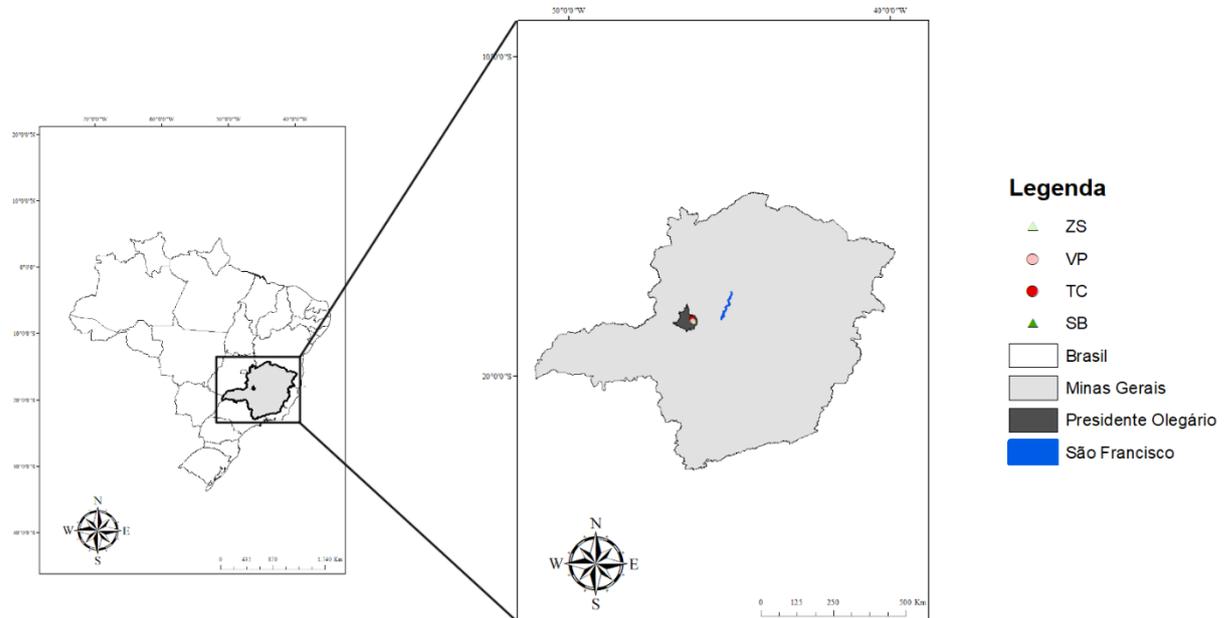
As perguntas investigadas foram: A) As populações encontradas em habitats semelhantes, porém em cavernas diferentes apresentam morfologias semelhantes? B) Quais modificações troglomórficas as populações apresentam? C) As populações em habitats diferentes têm graus diferentes de modificações troglomórficas, influenciados pelas características do habitat?

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 A área de estudos

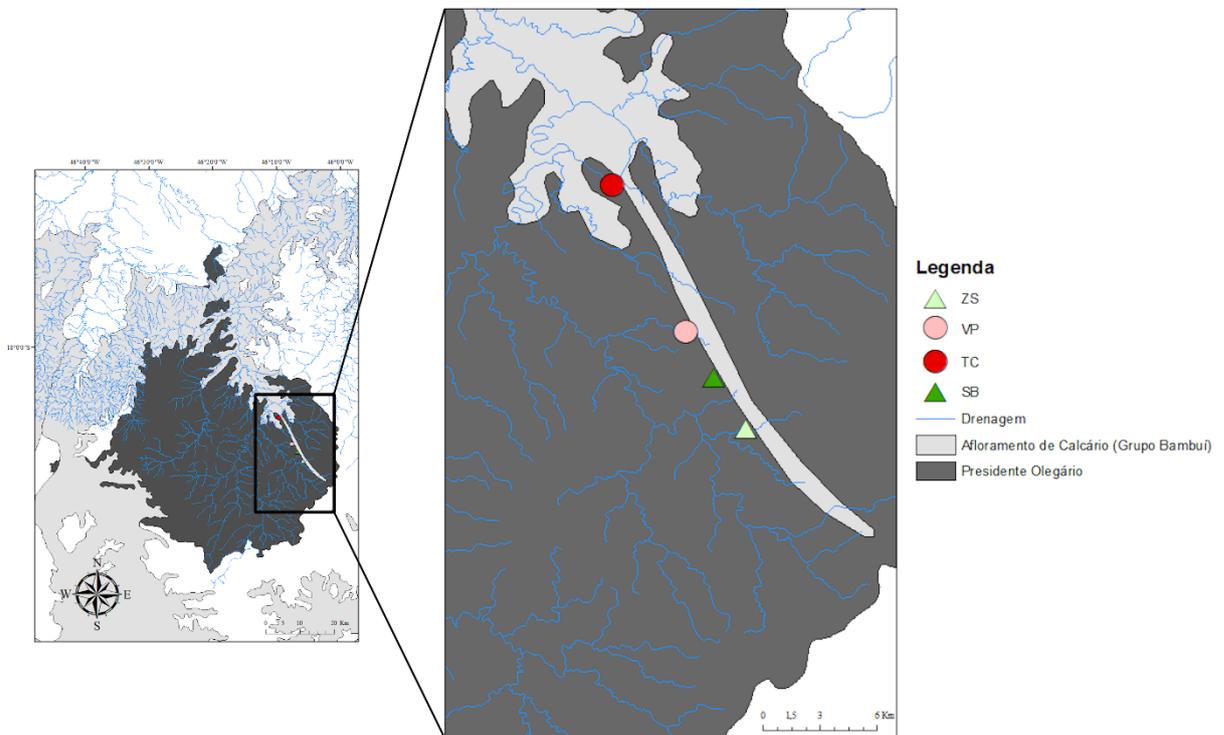
As cavernas estudadas pertencem ao município de Presidente Olegário em Minas Gerais, no sudeste do Brasil (18°25'4" S, 46°25'4" W) e localizam-se ao sul da bacia do Alto São Francisco (Fig. 1), nas drenagens da sub-bacia do Rio Paracatu (SECUTTI & BICHUETTE, 2013). As cavernas estão em um afloramento de calcário horizontal do Grupo Bambuí (Fig. 2; 3), que data da Era Proterozóica Superior. A elevação do local é de cerca de 900m e o clima é predominantemente sub-quente e semiúmido, com a estação seca começando no mês de abril e finalizando em agosto, totalizando cinco meses. A vegetação é tipicamente de cerrado, no entanto, vem sendo retirada devido a agricultura e a criação de pastagens para o gado (SECUTTI & BICHUETTE, 2013; RESENDE *et al.*, 2016).

Figura 1. Localização das cavernas estudadas em Presidente Olegário – MG.



Fonte: Do Autor (2020).

Figura 2. Localização das quatro cavernas no Afloramento de Calcário em Presidente Olegário – MG.



Fonte: Do Autor (2020).

Figura 3. Trecho do afloramento de calcário do grupo Bambuí em Presidente Olegário.



Fonte: LES-BIO (2019).

No total, quatro cavernas foram estudadas (Fig. 2). A primeira é a localidade-tipo da espécie *Hyaella veredae*, a caverna “Lapa Vereda de Palha” (VP) (18°15’18.77’’S, 46°07’33.63’’W). A entrada da caverna consiste em uma drenagem de sedimentos e tem presença de algumas raízes. A caverna é dividida em três níveis, o primeiro contém um riacho, o segundo uma sequência de várias represas de travertino (Fig. 4) e o último é seco (CARDOSO *et al.*, 2014; RESENDE *et al.*, 2016). A Lapa Vereda de Palha tem poucas conexões superficiais, e por isso contém poucos nutrientes alóctones, exceto por depósitos de guano em algumas câmaras. A espécie *H. veredae* foi coletada em uma represa de travertino em uma zona afótica.

Figura 4. Represa de Travertino da caverna Lapa Vereda da Palha, local-tipo da espécie *Hyaella veredae*.



Foto: LES-BIO (2019).

O segundo local onde há registro de *H. veredae* é a “Lapa Zé de Sidnei” (ZS) (18°18'05.62'' S, 46°05'40.63'' W) (Fig. 5). Um rio passa pela caverna, com alguns pontos de contato com a superfície, trazendo pouca matéria orgânica. Os anfípodes foram coletados em um riacho em zona de penumbra na caverna.

Figura 5. Foto do local onde foram coletados os anfípodes na Lapa Zé de Sidnei, durante a coleta de julho de 2019.



Foto: LES – BIO (2019).

O terceiro local é a “Toca do Charco” (TC) ($18^{\circ}11'05.63''S$, $46^{\circ}09'39.31''W$) (Fig. 6), menor caverna entre todas as amostradas e sem zona afótica, devido ao teto ser aberto. A vegetação do entorno está em processo de regeneração, apesar de *a priori* ter sido removida para criação de gado (RESENDE *et al.*, 2016). A caverna tem um grande lago lamacento, onde os crustáceos foram coletados, em uma zona de penumbra. Existem muitas raízes e plantas mortas no ambiente, fornecendo maior fonte de matéria orgânica (RESENDE *et al.*, 2016).

Figura 6. Trecho do lago da caverna Toca do Charco.



Foto: LES-BIO(2019).

A quarta e última localidade é denominada “Lapa da Fazenda São Bernardo” (SB) (Fig. 7), com coordenadas 18°16’36.83’’S, 46°06’45.52’’W. A área do entorno a esta cavidade é impactada por criação bovina. A caverna possui um riacho subterrâneo e várias aberturas que promovem uma entrada de luz nas câmaras e matéria orgânica. Na Lapa da Fazenda de São Bernardo os anfípodos foram coletados na zona de penumbra do riacho.

Figura 7. Trecho de água da caverna de Lapa de São Bernardo.



Foto: LES-BIO (2019).

As informações adicionais sobre as cavernas foram retiradas do artigo de Resende e colaboradores (2016), no entanto, as informações originais foram fornecidas a eles pelo Grupo Pierre Martin de Espeleologia/GPME, pers. com. Os mapas com o local das cavernas e suas características geográficas foram feitos pelo programa ArcGIS versão 10.3.

2. 2 A amostragem da *Hyalella veredae*

A espécie *Hyalella veredae* foi o organismo modelo desta pesquisa. Além da sua localidade-tipo, descrição taxonômica e características troglomórficas conhecidas, como a redução ou ausência de olhos na população e diferenças no tamanho das antenas (CARDOSO

et al., 2014), nada se sabe sobre seus aspectos ecológicos ou sobre sua relação com o ambiente.

Os crustáceos utilizados neste projeto foram coletados em dois períodos diferentes. O primeiro foi feito pela professora Dra. Maria Elina Bichuette e sua equipe do Laboratório de Estudos Subterrâneos (LES-BIO), da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. O período abrangeu cinco campanhas distintas, compreendendo os meses de setembro de 2013 a setembro de 2014. Os animais foram conservados em álcool 70% e levados ao laboratório LES-BIO da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, onde foram triados, identificados a nível de gênero e categorizados de acordo com seus traços troglomórficos. Após isso foram enviados ao Laboratório de Carcinologia da UFLA, onde foram identificados a nível de espécie.

O segundo período de coleta foi realizado pela equipe do Laboratório de Carcinologia da UFLA juntamente com a equipe do LES-BIO da UFSCar, em julho de 2019. Todas as quatro cavidades foram visitadas, sendo que em apenas três foi possível a coleta dos animais. A caverna “Toca do Charco” estava seca na extensão onde os animais ocorriam e nas poucas partes com água restante não foi avistado animal algum. Para a caracterização do ambiente, o aparelho de multiparâmetro Akso SX836 foi utilizado, para medir as seguintes variáveis ambientais: pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade e temperatura.

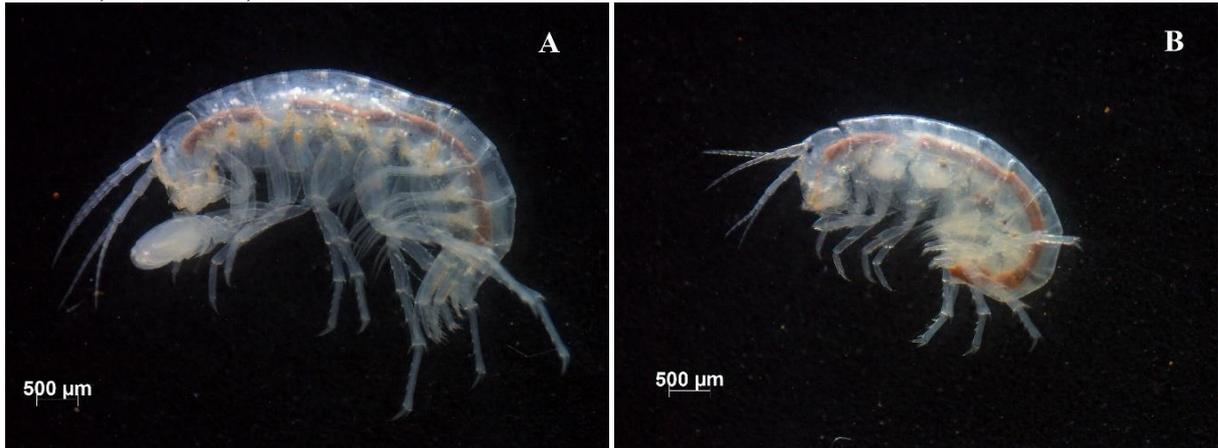
A amostragem foi através de busca ativa, sem determinação de tempo, mas com limite de animais possíveis de serem coletados, sendo de 15 a 20 no total, devido à população pequena destes organismos. Os anfípodas foram coletados com pipetas e/ou rede de mão e colocados em eppendorfs contendo álcool 70% para sua conservação. Os animais foram transportados e levados para Universidade Federal de Lavras, para a realização das análises de dados.

2. 2. 1 A coleta dos dados

No laboratório de Carcinologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, os indivíduos de cada localidade passaram por duas etapas. As etapas foram realizadas para medir de forma precisa os caracteres morfológicos que foram utilizados nas análises estatísticas. Os caracteres mensurados, sendo eles o tamanho total (CT), tamanho da cabeça (CC), tamanho olhos e pereiópodas de 4 a 7, foram escolhidos por serem as mais comumente modificadas em anfípodas de habitats subterrâneos (FIŠER *et al.*, 2012; HOWARTH & MOLDOVAN, 2018).

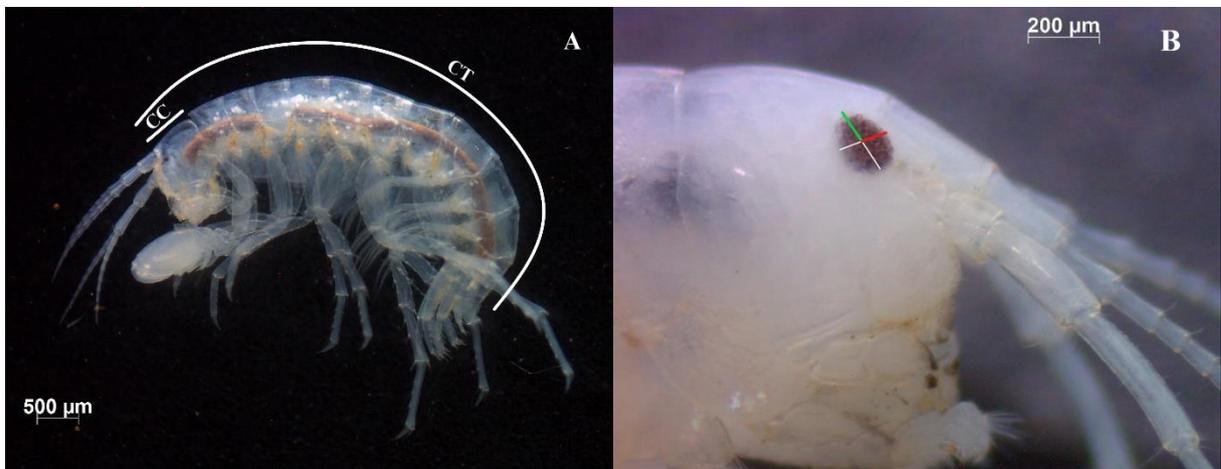
A primeira consistiu em fotografar todos os animais (Fig. 8) com um auxílio de uma estereomicroscopia ZEISS Stemi com câmera acoplada. Através das fotos e o software Carl Ziess AxioVision Se64 Rel 4.8.3 foi possível medir o tamanho dos olhos (Fig. 9B), o tamanho total das antenas (Fig. 10), o comprimento da cabeça (CC) e o comprimento total (CT) (Fig. 9A).

Figura 8. Exemplos de macho e fêmea da espécie *Hyaella veredae*, coletados na Toca do Charco sendo A) Macho e B) Fêmea.



Fotos: Do Autor (2019).

Figura 9. A) Medidas que foram usadas para calcular CC e CT dos anfípodas; B) Comprimentos utilizados para calcular a área dos olhos, sendo as cores verde e vermelho representando os raios (r).



Fotos: Do Autor (2019).

A segunda etapa consistiu em medir o tamanho total das antenas e dos pereiópodos IV, V, VI e VII (Fig. 10). Para que estas medições fossem possíveis, a dissecação e confecção lâminas permanentes foram realizadas para cada indivíduo estudado.

Figura 10. O traço mais escuro e central representa o local que foi utilizado para fazer as medidas de tamanhos totais das antenas e pereiópodos IV, V, VI, VII. A primeira imagem representa uma antena e a segunda um pereiópodo 6.

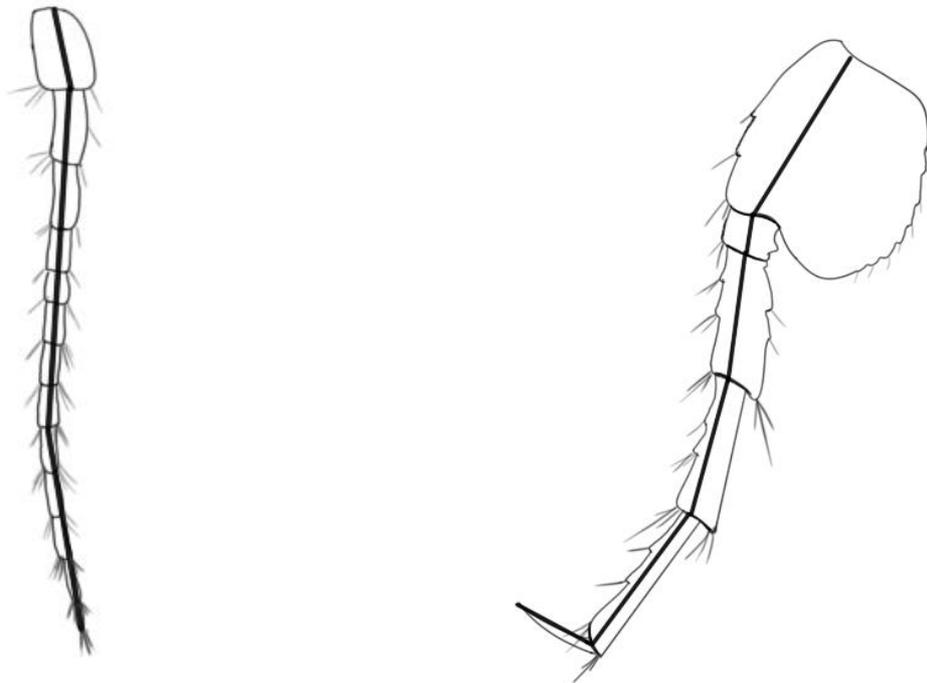


Imagem: Do Autor (2020).

Os animais foram previamente corados em Vermelho Congo, por 4 a 12 horas (o tempo variou entre indivíduos), posteriormente colocados em lâminas escavadas com óleo (Johnson's baby) para dissecação. Em um estereomicroscópio ZEISS Stemi, os apêndices locomotores foram retirados com o auxílio de agulhas, e o restante do corpo conservado em eppendorfs com álcool 70%.

Os pereiópodos foram colocados em lâminas com balsamo do Canadá, previamente aquecido por um minuto em placa aquecedora a 50°C, e cobertos com lamínula e recolocados na placa aquecedora por mais 2 minutos em média, para remoção de eventuais bolhas. A fim de acelerar o processo de secagem, as lâminas foram colocadas em estufa pôr em média 2 dias a 50°C. Em seguida as estruturas foram fotografadas com um microscópio ZEISS Primo Star com câmera acoplada.

2. 2. 2 Confirmação da Espécie

Foi necessário verificar se os organismos coletados nas outras três cavidades, Toca do Charco, Lapa de São Bernardo e Lapa Zé de Sidnei, eram representantes da espécie *Hyaella veredae*, já que estes novos locais de ocorrência eram até então desconhecidos para a espécie. Para isto, dois machos e duas fêmeas de cada caverna foram completamente dissecados durante o processo confecção das lâminas permanentes no momento da coleta dos dados, explicado no tópico anterior.

A confirmação da espécie foi feita comparando as lâminas dos organismos de cada caverna com o artigo de descrição da espécie (CARDOSO *et al.*, 2014) e com as lâminas permanentes de *H. veredae* depositadas na coleção do laboratório de Carcinologia da UFLA.

As comparações entre a bibliografia e o material permitiram identificar que estas populações são da espécie *Hyaella veredae*, devido a diversas semelhanças morfológicas. A confirmação veio pela presença das seguintes características morfológicas nos indivíduos: presença de olhos reduzidos ou ausentes, brânquias esternais presentes do segmento 2 ao 7, irregularidade da palma do gnatópodo 2 dos machos e a presença “*comb scales*” na margem posterior do própodo e duas fileiras no lobo posterior do carpo do gnatópodo 2.

2. 3 Análises dos dados

A área dos olhos foi calculada através da fórmula da elipse: $A = \pi \times r \times r$, sendo “r” o valor do raio de cada um dos lados (maior e menor), como demonstrado na Fig. 8, B, (CULVER, 1987). Sendo que os comprimentos, foram divididos por 2 para obter o valor da variável.

A fim de evitar problemas relacionados a diferença de tamanho dos apêndices corporais, associados a fatores como idade e sexo entre os organismos, trabalhou-se com a razão dos traços troglomórficas com o restante do corpo. Os tamanhos dos pereiópodos e antenas foram relacionados ao tamanho do corpo, enquanto o tamanho dos olhos foi relacionado ao tamanho da cabeça.

Para responder às perguntas relacionadas à diferença e semelhança entre os apêndices corporais e o habitat, os habitats dentro das cavernas foram categorizados da seguinte maneira:

- A) Lênticos (Lentic): Aqueles onde os organismos foram encontrados em ambientes com ausência de fluxo de água, como lagos/poças;

B) Lóticos (Lotic): Habitat onde existe fluxo de água maior, como por exemplo, riachos.

Partindo desta categorização, os locais onde ocorre a *Hyalella veredae* nas cavernas “Lapa de São Bernardo” e “Lapa Zé de Sidnei” foram considerados Lóticos, enquanto para “Lapa Vereda da Palha” e “Toca do Charco” encaixaram-se na categoria de Lênticos.

2. 3. 1 Análises estatísticas dos traços troglomórficos

Os tamanhos máximos, mínimos, médios e desvio padrão foram calculados para todas as cavernas e para cada categoria analisada. Os resultados foram plotados em uma tabela, juntamente com o N amostral.

Inicialmente foi feito um teste de normalidade de Shapiro-Wilk, onde não foi constatada normalidade para nenhum dos dados, então seguiu-se para testes não-paramétricos.

A comparação entre as médias dos valores dos apêndices foi feita através do teste Mann-Whitney (U de Wilcoxon, no R), com 5% de intervalo de confiança. A comparação foi feita entre ambientes lóticos e lênticos para cada um dos traços analisados.

Após o teste de médias, apenas aquelas que foram significativas foram consideradas para a realização de uma Análise de Componentes Principais, ou PCA. A PCA foi utilizada para analisar a distribuição dos dados em relação aos ambientes lóticos e lênticos. Uma PCA de cada caverna também foi feita para avaliar se realmente os organismos presentes em ambientes considerados lênticos e lóticos eram mais parecidos ou não morfologicamente. Os gráficos de PCA foram plotados, usando as Dimensões 1 e 2.

Todas as análises foram feitas através do programa R versão 3.6.1, bem como a criação dos gráficos *boxplot*. O teste de Mann-Whitney foi feito com o comando pré-existente no pacote básico do programa, assim como Shapiro-Wilk. Já a PCA, foi feita com o pacote “FactoMiner” e “FactoExtra” (LÊ *et al.*, 2008). Os gráficos de *boxplot* foram montados pelo pacote “ggplot2” (WICKHAM, 2011) e as cores dos gráficos pelo pacote “RColorBrewer” (NEUWIRTH & BREWER, 2014).

3 RESULTADOS

3. 1 Os organismos coletados

Ao todo, 108 indivíduos foram analisados, sendo 49 de ambientes lênticos (VP e TC) e 59 de lóticos (SB e ZS). A caverna com amostragem mais significativa foi a Toca do Charco

(N = 46), seguida pela Lapa de São Bernardo (N = 40), Zé de Sidnei (N = 19) e por último a Lapa Vereda da Palha (N = 3) (Tabela 1). A Lapa Vereda da Palha é o local-tipo deste crustáceo, mesmo assim poucos organismos foram coletados nas represas de travertino observadas.

Tabela 1. Tabela com tamanhos médios, mínimos e máximos para as populações de *Hyalella veredae* coletados, separados por habitat e caverna analisadas.

Hab	N	Tam	CC	CT	O	A1	A2	P4	P5	P6	P7
Len	49	Máx	0,56	6,49	0,027	2,26	2,64	2,73	2,72	3,37	3,52
		Mín	0,24	2,57	0,001	0,98	0,95	0,58	0,73	0,77	0,92
		Méd	0,46	5,13	0,004	1,58	1,69	1,91	1,90	2,36	2,34
		DP±	0,07	0,07	0,004	0,30	0,40	0,51	0,47	0,47	0,67
Lót	59	Máx	0,65	6,75	0,16	2,56	2,89	2,54	7,73	2,56	3,34
		Mín	0,30	2,67	0,001	0,97	0,99	0,53	0,47	0,47	0,60
		Méd	0,48	5,01	0,015	1,65	1,80	1,73	1,77	2,34	2,02
		DP±	0,08	0,08	0,027	0,36	0,46	0,48	0,57	1,04	0,75
SB	40	Máx	0,65	6,75	0,13	2,56	2,89	2,54	3,14	2,52	3,34
		Mín	0,30	2,67	0,001	0,97	0,99	0,53	0,47	0,47	0,60
		Méd	0,48	4,99	0,013	1,67	1,86	1,78	1,77	2,25	2,05
		DP±	0,08	0,98	0,02	0,53	0,75	0,89	0,93	1,14	1,07
TC	46	Máx	0,59	6,49	0,027	2,26	2,64	2,73	2,72	3,37	3,52
		Mín	0,24	2,57	0,001	0,98	0,95	0,58	0,73	0,77	0,92
		Méd	0,46	5,17	0,004	1,56	1,67	1,89	1,88	2,35	2,32
		DP±	0,09	1,26	0,004	0,53	0,64	0,88	0,78	0,98	1,00
VP	3	Máx	0,43	4,48	0,005	2,19	2,57	2,37	3,11	2,39	3,07
		Mín	0,41	4,09	0,005	1,73	1,78	2,37	2,39	3,11	3,07
		Méd	0,42	4,29	0,005	1,96	2,17	2,37	2,39	3,11	3,07
		DP±	0,01	0,28	0,03	0,32	0,56	1,6	1,69	2,20	2,17
ZS	19	Máx	0,61	6,75	0,16	2,55	2,66	2,47	7,73	2,56	3,22
		Mín	0,36	3,89	0,002	1,17	1,29	0,70	0,75	0,80	0,90
		Méd	0,47	5,05	0,02	1,61	1,70	1,65	1,78	2,51	1,98
		DP±	0,07	0,87	0,03	0,30	0,30	0,67	0,70	1,60	0,80

Legenda: “Hab” – Refere-se a Habitat; “Tam” – Ao Tamanho ; “Len” – A lântico; “Lot” – A lótico N – Ao número de Indivíduos; CC – Cabeça; CT – Comprimento total; O – Olhos; A1- Antena 1; A2 – Antena 2; P4 – Pereiópodo 4; P5 – Pereiópodo 5; P6 – Pereiópodo 6; P7 – Pereiópodo 7; DP - Desvio padrão. SB – Lapa de São Bernardo; TC – Toca do Charco; VP – Lapa Vereda da Palha; ZS – Lapa Zé de Sidnei. Fonte: Do Autor (2019).

Na caverna Toca do Charco, só foram coletados organismos durante o intervalo de 2013 a 2014. O ambiente que antes era uma lagoa grande e lamacenta estava parcialmente seco exatamente no local onde os organismos foram amostrados anteriormente. Embora tenha-se utilizado outras metodologias de coleta, como por exemplo a isca, nenhum anfípode foi coletado nesta cavidade em julho de 2019.

A caverna Lapa Zé de Sidnei também se encontrava seca no segundo período de coleta. O local que antes era um riacho contínuo, estava separado em porções de água. Foi nesta coleta que se obteve o maior número de organismos representantes desta cavidade.

Os anfípodos apresentaram características tipicamente troglomórficas, como a ausência ou diminuição da área dos olhos e aumento dos apêndices corporais. As cavernas onde os organismos apresentaram a ausência dos olhos foram: a Lapa Vereda da Palha (Fig. 11, I) e Zé de Sidnei, sendo nesta última apenas nos organismos capturados na primeira coleta. Já os crustáceos da Toca do Charco e Lapa de São Bernardo apresentaram a redução da área dos olhos, porém em graus diferentes (Fig. 11, II e III).

Fig. 11. I) Anofthalmia de um anfípode da caverna “Lapa Zé de Sidnei; II) Olhos reduzidos do organismo da “Toca do Charco”; III) Olhos desenvolvidos dos organismos presente na caverna “Lapa de São Bernardo”.



Fotos: Do Autor (2020).

O aumento no tamanho dos apêndices, foram observados nas antenas e os pereiópodos IV, V, VI e VI para todas as populações estudadas (Tabela 1; Tabela 3). Houve organismos em que a antena representou 38% do tamanho corporal, por exemplo. Já em relação aos pereiópodos, houve indivíduos em que os apêndices P4 representou 39%, P5 62%, P6 47% e P7 57% do tamanho corporal.

Em relação às variáveis abióticas, as cavernas apresentaram valores muito aproximados para quase todos parâmetros medidos, tendo características ambientais parecidas (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis abióticas medidas para todas as cavernas amostradas.

Caverna	Temp (°C)	Cond (mS/cm)	Ph	OD (mg/L)
Vereda da Palha	15.7	507	8.14	10.69
Toca do Charco	18.1	533	6.93	1.38
Lapa São Bernardo	16.4	512	7.62	6.95
Zé de Sidnei	14.1	539	7.61	10.31

Obs: “Temp” refere-se a temperatura, “Cond” a condutividade e “OD” ao Oxigênio Dissolvido.

Fonte: Do Autor (2020).

3. 2 Traços Troglomórficos

Através do teste de Mann-Whitney foi possível verificar uma diferença no tamanho dos olhos, antenas e pereiópodos das populações estudadas quando comparados ao tamanho do corpo (Tabela 3). O tamanho dos olhos ($p < 0.001$) e comprimento da antena 2 ($p < 0.001$) diferiram significativamente entre habitats, seguidos pela antena 1 ($p = 0.005$), P7 ($p = 0.009$), P4 ($p = 0.019$) e P5 ($p = 0.033$), respectivamente. Os anfípodes foram semelhantes no tamanho corporal e tamanho de cabeça, e não houve diferença significativa entre estas variáveis para os ambientes lênticos e lóticos (Tabela 3).

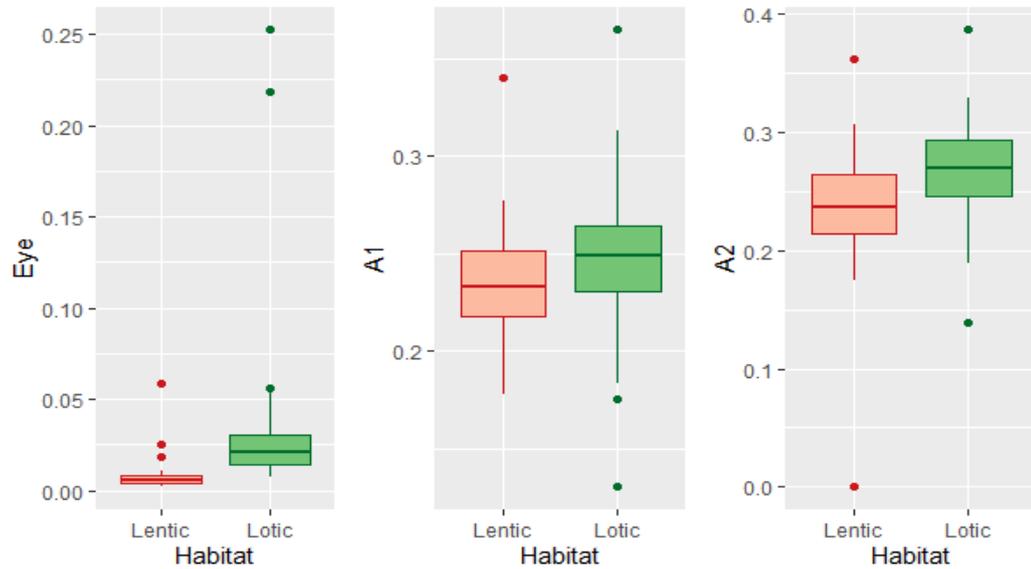
Tabela 3. Comparação das variáveis entre os habitats lênticos (SB e ZS) e lóticos (VP e TC) através do teste Mann-Whitney(U)

Variável	U	P <0,05
CC	1146.5	0,127
CT	1489	0,395
O	149	<0,001*
A1	845	0,005*
A2	675	<0,001*
P4	1185	0,019*
P5	1214	0,033*
P6	1059	0,54
P7	1323	0,009*

Legenda: CC – Cabeça; CT – Comprimento total; O – Olhos; A1- Antena 1; A2 – Antena 2; P4 – Pereiópodo 4; P5 – Pereiópodo 5; P6 – Pereiópodo 6; P7 – Pereiópodo 7. SB – Lapa de São Bernardo; TC – Toca do Charco; VP – Lapa Vereda da Palha; ZS – Lapa Zé de Sidnei. Os valores de p seguidos de “*” demonstram que foram significativos pelo teste. Fonte: Do Autor (2020).

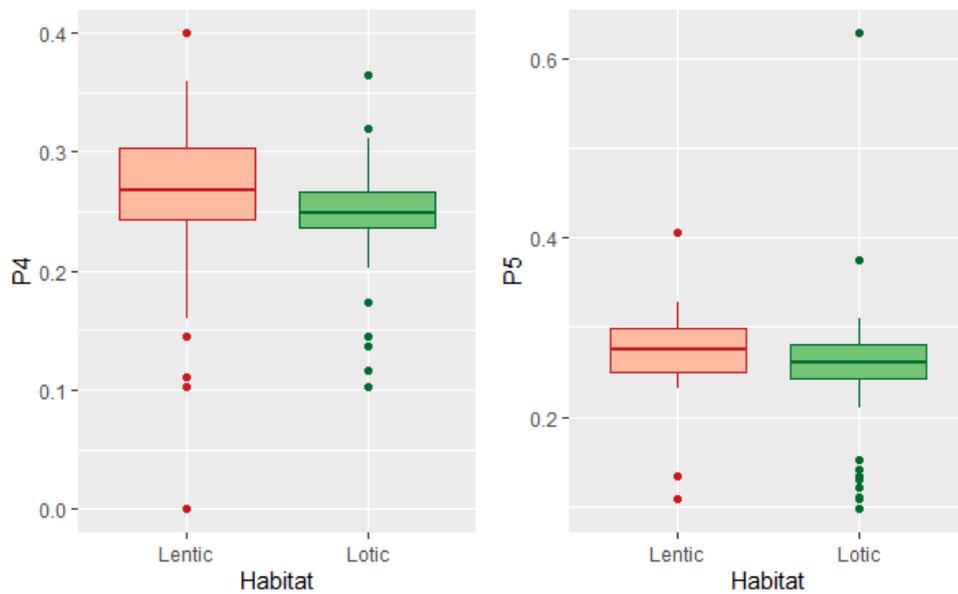
Ao plotarmos esses resultados em *boxplots*, percebemos que os maiores tamanhos médios para antenas e olhos estavam relacionados aos ambientes lóticos, enquanto os maiores tamanhos médios de pereiópodos encontravam-se nas populações que estavam em ambientes lênticos (Fig. 12, 13 e 14; Tabela 1). Apenas o pereiópodo 6 não apresentou diferença significativa entre os ambientes, ou seja, as populações das quatro cavidades tinham em média o mesmo tamanho de P6 (Fig. 14, Tabela 1). A diferença na área média ocupada pelos olhos (Fig. 12) é facilmente observada, quando colocado organismos da TC (Fig. 11. I) e VP ao lado das populações de SB e ZS (Fig. 11. II e III).

Figura 12. *Boxplot* demonstrando efeito dos habitats sobre o tamanho das variáveis analisadas por ambiente. Legenda: Eye - Olhos; A1 – Antena 1; A2 – Antena 2; Lentic – Ambiente Lântico; Lotic – Ambiente Lótico.



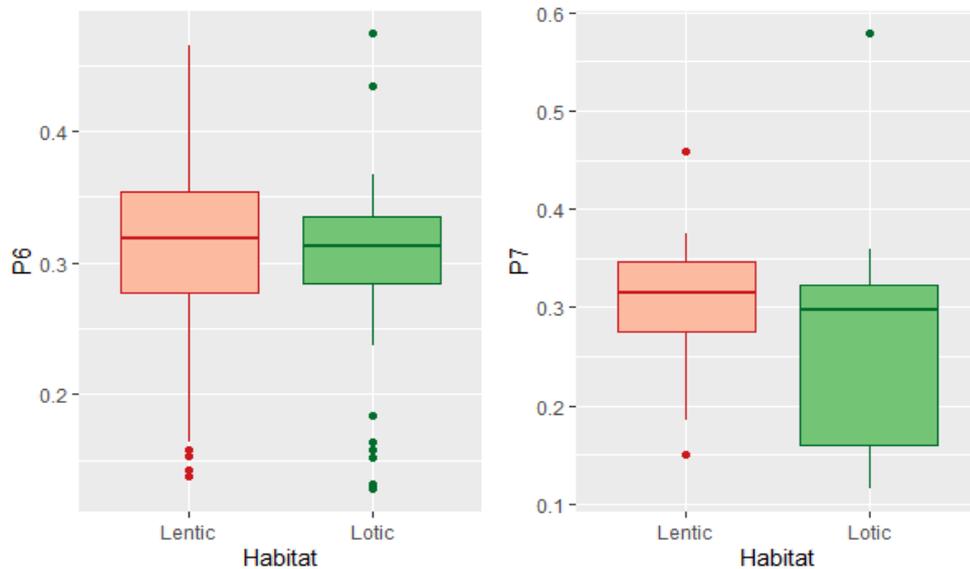
Fonte: Do Autor (2020).

Figura 13. *Boxplot* demonstrando efeito dos habitats sobre o tamanho das variáveis analisadas por ambiente. Legenda P4 – Pereiópodo 4; P5 – Pereiópodo 5; Lentic – Ambiente Lântico; Lotic – Ambiente Lótico.



Fonte: Do Autor (2020).

Figura 14. *Boxplot* demonstrando efeito dos habitats sobre o tamanho das variáveis analisadas por ambiente. Legenda: P6 – Pereiópodo 6; P7 – Pereiópodo 7; Lentic – Ambiente Lêntico; Lotic – Ambiente Lótico.

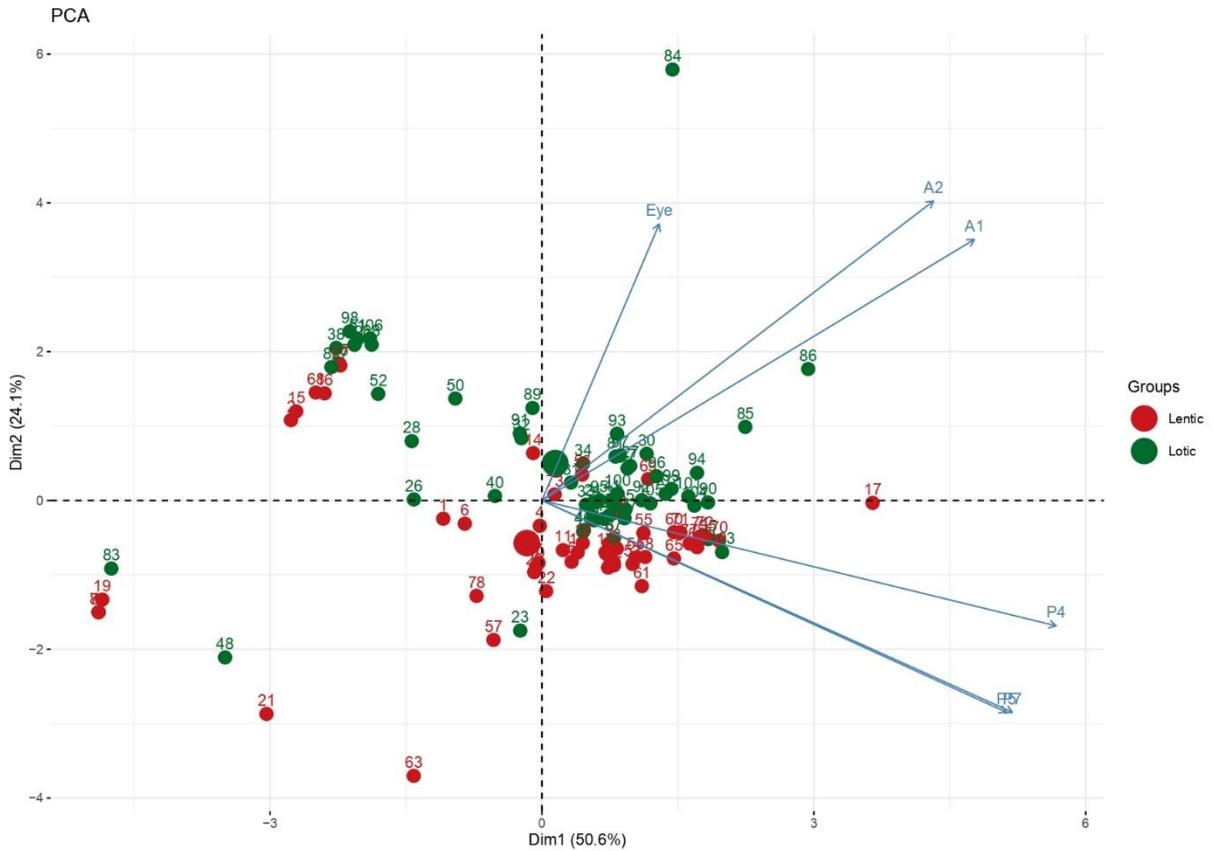


Fonte: Do Autor (2020).

Pela Análise de Componentes Principais (PCA), observa-se que existe um início de diferenciação morfológica destes organismos. As dimensões 1 (50.6%) e 2 (24.1%) explicaram 74.7% da variância dos dados. A PCA (Fig. 15) com separação apenas em relação ao tipo de ambiente, demonstra uma sobreposição, no entanto, com uma diferenciação entre as populações dos ambientes. Em relação às dimensões, na dimensão 2 as variáveis mais explicativas foram Eye, A1 e A2, respectivamente, enquanto as variáveis pereiópodo IV, V e VII se correlacionaram com ambas as dimensões.

A PCA também evidencia a relação vista através dos gráficos *boxplot*. Os indivíduos presentes em ambientes lóticos se relacionaram mais com as variáveis olhos e antenas, sendo as antenas 1 e 2 correlacionadas; os organismos presentes em locais lênticos se relacionam mais aos pereiópodos, e os pereiópodos V e VII são fortemente correlacionados.

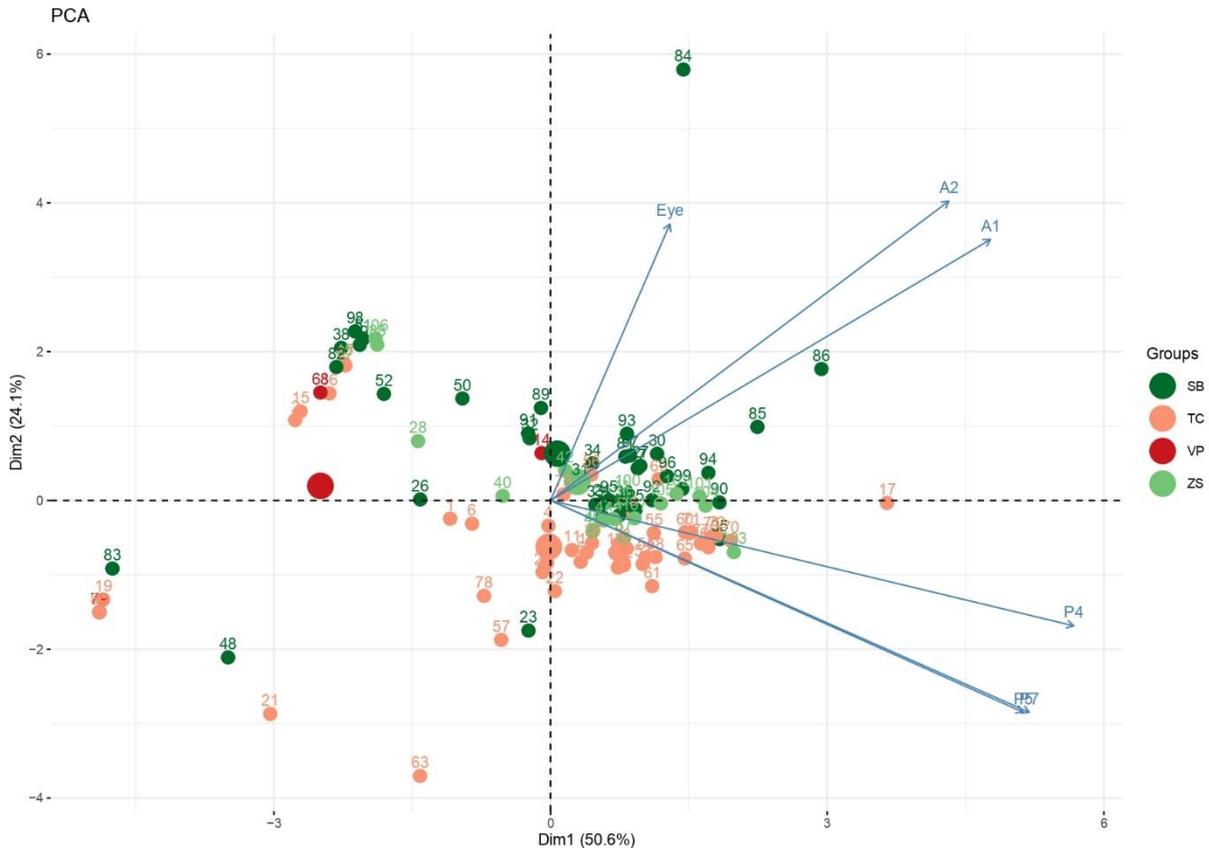
Figura 15. Análise de componentes principais (PCA) para as populações de anfípodes cavernícolas, categorizados em ambientes lóticos ou lênticos. Legenda: Eye – Olhos; A1 – Antena 1; A2 – Antena 2; P4; Pereiópodo 4; P5 – Pereiópodo 5 e P7 – Pereiópodo 7. Cada ponto representa um indivíduo da espécie *Hyalella veredae*.



Fonte: Do Autor (2020).

Ao realizar uma PCA categorizando os organismos pela caverna encontrada, percebe-se que existe um agrupamento entre os ambientes considerados lóticos ou lênticos. A Lapa de São Bernardo e a Lapa Zé de Sidnei se agruparam, enquanto a Toca do Charco ficou mais separada do grupo, apesar da pequena sobreposição (Fig. 16). A Lapa Vereda da Palha (simbolizada pelo quadrado no gráfico PCA), com apenas três indivíduos coletados, teve sua morfologia associada a TC em apenas um indivíduo, a SB em outro e o terceiro distante de qualquer uma das cavidades e variáveis.

Figura 16. Análise de componentes principais (PCA) para as populações de anfípodas cavernícolas, separado por cavernas. Legenda: SB – Refere-se a Lapa de São Bernardo; TC – Toca do Charco; VP – Vereda da Palha; ZS – Zé de Sidnei; Eye – Olhos; A1 – Antena 1; A2 – Antena 2; P4; Pereiópodo 4; P5 – Pereiópodo 5 e P7 – Pereiópodo 7. Cada ponto representa um indivíduo da espécie *Hyalella veredae*.



Fonte: Do Autor (2019).

4 DISCUSSÃO

A espécie troglóbia *Hyaella veredae* é a única espécie cavernícola conhecida do gênero que ocorre em mais de uma caverna. Em geral, tanto os organismos do gênero *Hyaella* quanto a ordem Amphipoda têm uma alta taxa de espécies endêmicas, principalmente quando se refere aos organismos troglóbios (VÄINÖLÄ *et al.*, 2007). Tal padrão pode estar associado a dois fatores, o primeiro relacionado a baixa capacidade dispersiva desses organismos (VÄINÖLÄ *et al.*, 2007; WELLBORN & CAPPS, 2013) e o segundo a fragmentação dos ambientes subterrâneos, que ao formar barreiras geográficas favorece a especiação (ZAKŠEK *et al.*, 2009).

Já a presença de diferentes populações em mais de uma caverna é pouco comum. Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre isso, como por exemplo, um evento raro de dispersão envolvendo dispersão por pelos de vertebrados ou mesmo pulsos de inundação (SWANSON, 1984; MOLDOVAN, *et al.*, 2012) somado à necessidade de um propágulo pequeno, mas efetivo, na colonização (WELLBORN & CAPPES, 2013). A Figura 2 demonstra que as cavernas estão todas alinhadas no afloramento de calcário e em drenagens do Rio Paracatu, permitindo (ou já permitiu) a dispersão desta espécie por mais de uma

caverna. Porém, não é possível confirmar esta hipótese, já que ainda não foi feito um mapeamento geológico destes ambientes, demonstrando a ligação desses cursos d'água.

Além dessas populações estarem em mais de uma caverna, elas também apresentam variabilidade morfológica intraespecífica, com variabilidade tanto entre populações como na mesma população (CARDOSO *et al.*, 2014). A variabilidade fenotípica de *Hyalella veredae* encontrada nos caracteres troglomórficos analisados (olhos, antenas e pereiópodos), demonstrou uma variação significativa entre os habitats estudados. Baseando-se nisto as populações podem ser definidas como dois ecótipos: um associado a ambientes lóticos, com antenas e olhos grandes e pereiópodos menores e outro a lênticos, com indivíduos com grandes pereiópodos e olhos pequenos ou ausentes, como demonstram as análises estatísticas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa assemelham-se com os padrões encontrados para *Niphargus croaticus* Jurinac, 1888, onde as populações diferenciam-se de acordo com o tipo de habitat ou microhabitat colonizado (DELÍĆ, *et al.*, 2016). Tal padrão já havia sido percebido para *Niphargus* Schiödte, 1849, para o qual foram reconhecidas classes morfológicas de acordo com o ambiente em que estes organismos se encontravam (TRONTELJ *et al.*, 2012).

As variações fenotípicas no ambiente subterrâneo podem estar relacionadas a diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, como tamanho do habitat, presença de espécies competidoras, fluxo de água e etc (TRONTELJ *et al.*, 2012; DELÍĆ *et al.*, 2016; PIPAN & CULVER, 2017). Isso pode ser validado ao avaliar as populações de ambientes lóticos e lênticos da *Hyalella veredae*. Mesmo em cavernas diferentes, os habitats analisados se assemelharam, os organismos encontrados apresentaram morfologias similares, enquanto os organismos do ambiente lêntico diferiram do restante. Isto demonstra que as modificações vão além das propriedades intrínsecas e unificadoras do meio subterrâneo, como alguns pesquisadores já sugeriram (ROMERO & GREEN, 2005; DELÍĆ *et al.*, 2016 FIŠER, 2019).

Nos anfípodos *H. veredae*, as diferenças encontradas nos apêndices possivelmente influenciam o sucesso de sobrevivência destes organismos, já que nas antenas e os pereiópodos, onde se localizam as estruturas sensoriais responsáveis pelo forrageio e sucesso reprodutivo (THIEL & BREITHAUPT, 2011; CULVER, 1970; FIŠER *et al.*, 2013). O parâmetro que mais influenciou estas diferenças está possivelmente associado ao fluxo de água, variável pertencente a qualquer ambiente aquático seja ele epígeo ou não (THORP & COVICH, 2001).

Os indivíduos de *H. veredae* com os menores pereiópodos estavam presentes em ambientes categorizados como lóticos. Padrão também encontrado em espécies de

Niphargus, *Gammarus minus* Say, 1818 e *Crangonyx antennatus* Packard, 1881 (DICKSON 1977; FONG, 1989; TRONTELJ *et al.*, 2012; DELIĆ, *et al.*, 2016). A diminuição dos pereiópodos, nestes estudos, mostrou-se associada à presença de grandes sedimentos no fundo (por exemplo, matacão e seixos), característicos de ambientes deste tipo (THORP & COVICH, 2001; TRAJANO & BICHUETTE, 2006). Sedimentos grandes servem de refúgio a estes animais, porém podem causar danos morfológicos às suas frágeis estruturas locomotoras em momentos de aumento de fluxo (CULVER 1970; 1971; DICKSON, 1977; WILZBACH *et al.*, 1988; TRONTELJ *et al.*, 2012). Tamanhos menores de pereiópodos seriam um *trade-off* para a adaptabilidade a estas características (FIŠER, 2019).

O mesmo padrão foi encontrado para os pereiópodos de *Niphargus* em ambientes lênticos. As populações de *H. veredae* presentes nestes habitats foram as que apresentaram os maiores pereiópodos. O incremento de tamanho nestas estruturas pode estar associado à função destes apêndices, oligotrofia do ambiente e a locomoção (TRAJANO & BICHUETTE, 2006; THIEL & BREITHAUPT, 2011; KOVÁČ, 2018; KRALJ-FIŠER *et al.*, 2020). O alongamento aumentaria a percepção de qualquer estímulo, facilitando o encontro de alimento, outros indivíduos, e também facilitaria a movimentação mais rápida. (CULVER & PIPAN, 2010; THIEL & BREITHAUPT, 2011; KOVÁČ, 2018; KRALJ-FIŠER *et al.*, 2020).

No entanto, as populações de *Hyalella veredae* diferiram dos outros estudos já feitos com anfípodes troglóbios em um único ponto, o tamanho das antenas. Enquanto para *Niphargus* e *Gammarus minus* as antenas foram maiores em ambientes lênticos (FONG, 1989; DELIĆ *et al.*, 2016), para *H. veredae* ocorreu o contrário.

Ao pensarmos que no ambiente lótico houve uma seleção de tamanhos menores dos apêndices para evitar danos (DICKSSON, 1977), podemos especular que talvez o aumento das antenas nestes ambientes surja como uma compensação sensorial ao tamanho dos pereiópodos. Desta forma a percepção de estímulos se daria principalmente pelas antenas (THIEL & BREITHAUPT, 2011).

Já a diferença do tamanho dos olhos encontrados nestes anfípodes pode ser decorrente da incidência ou não de luz e a compensação metabólica, e não necessariamente ao habitat da caverna (JONES & CULVER, 1989; CULVER & PIPAN, 2010; FONG, 2019). Os organismos da Lapa Zé de Sidnei, São Bernardo e Toca do Charco foram encontrados em zonas de penumbra (com incidência indireta de luz) e tinham olhos, porém em tamanhos diferentes, enquanto os da Vereda da Palha estavam em um local afótico, sendo este último justamente os que não tinham olhos.

Um estudo feito com o peixe *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 revelou que a perda dos olhos estava relacionada com o gradiente de luz no ambiente subterrâneo, onde à medida que diminuía a quantidade de luz, menor era o tamanho dos olhos (FONTAINER & TOBLER, 2009). Já em estudos com anfípodas, como o *G. minus*, existem hipóteses que a perda/diminuição dos olhos esteja relacionada ao menor consumo de energia (FONG, 2019). Isso leva a uma compensação sensorial em resposta ao aumento dos apêndices sensoriais, como os pereiópodos por exemplo (FONG, 1989). Esta última pode ser significativa no caso da *H. veredae* já que os maiores olhos estavam nos locais com menores apêndices locomotores, os lóticos.

Porém, alguns pesquisadores como Culver e colaboradores (1995) associam essa variação intraespecífica dos olhos ao tempo em que estes organismos invadiram e colonizaram o ambiente subterrâneo. O isópode *Asellus aquaticus* Linnaeus, 1758, por exemplo, apresenta diferença entre populações e dentro da mesma população no tamanho dos olhos (PROTAS & JEFFREY, 2012) justificados por eles serem “cavernícolas-recentes” (TURK *et al.*, 1996). Para *H. veredae* não foram feitas análises de tempo de entrada na caverna, por isso não é possível afirmar que as diferenças são devidas a tempo evolutivo.

É notório que existe uma variabilidade fenotípica associada ao ambiente subterrâneo e aos habitats que o compõe, em relação a *H. veredae*. As modificações existentes são claramente resultados do ambiente subterrâneo, mas assim como em Romero & Green (2005), Romero (2011) e Fišer (2019), esta pesquisa demonstra que os graus de modificações são uma soma entre as características gerais do ambiente e processos ecológicos de adaptação ao habitat. Os organismos cavernícolas, para obterem sucesso de colonização e permanência, precisam se adaptar aos nichos muito restritos do ambiente subterrâneo (FIŠER *et al.*, 2012), o que acarreta diferentes graus de modificações troglomórficas, aumentando a diversidade morfológica.

As diferenças morfológicas presentes em anfípodas são resultados de múltiplos *feedbacks* entre os processos evolucionários e ecológicos (METRI *et al.*, 2016; JOURDAN *et al.*, 2019). Para os anfípodas *G. minus* e *N. croaticus*, por exemplo, houve uma seleção de ecótipos de acordo com a pressão de seleção sofrida (DELIĆ *et al.*, 2016; FONG, 2019). Ou seja, apesar das populações de *H. veredae* apresentarem semelhanças morfológicas, como o tamanho total e da cabeça, existem características que os diferenciam e que são adaptações ao ambiente ao qual foram submetidos.

Nossos resultados indicam que a plasticidade fenotípica pode ser o motor de adaptação ao meio subterrâneo e aos ambientes existentes dentro dele, como já sugeriu Romero, 2011.

Ter um genótipo que seja plástico permite a colonização principalmente de ambientes tão extremos e restritos quanto o hipógeo (ROMERO & GREEN, 2005). E assim também promover o surgimento de diferentes ecótipos mesmo dentro do ambiente hipógeo, devido às micro diferenças existentes no habitat, onde a especialização em nichos, como ambientes lóticos e lênticos, já se demonstrou essencial para a permanência em ambientes subterrâneos (FIŠER *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho encontramos que as populações localizadas em habitats semelhantes apresentaram morfologias corporais semelhantes, mesmo estando em cavernas diferentes, respondendo a primeira pergunta proposta no objetivo. Da mesma forma que os diferentes graus de modificações troglomórficas, variaram de acordo com as condições ambientais as quais eles foram submetidos, respondeu a terceira pergunta desta pesquisa.

Desta forma foi possível concluir que existe uma variabilidade fenotípica entre as populações da espécie *Hyaletta veredae*. Assim, a premissa de que os organismos de caverna sofrem uma pressão direcional é reafirmada, no entanto, o quão modificado este organismo será depende de outras variáveis ecológicas, e que não são necessariamente intrínsecas ao ambiente de caverna.

Em relação a segunda pergunta, foi possível verificar que estes organismos apresentam mais uma modificação troglomórfica do que as citadas em seu artigo de descrição, sendo ela o aumento dos apêndices corporais. A modificação mais comum, a alteração do tamanho dos olhos, possivelmente está relacionada às características globais do ambiente subterrâneo: ausência permanente de luz e a oligotrofia.

Já em relação aos apêndices locomotores e sensoriais, os pereiópodos e as antenas têm suas modificações relacionadas tanto ao seu habitat como ao ambiente subterrâneo em si, tendo pesos diferentes para cada pressão. Tais estruturas estão muito ligadas ao sucesso de vida destes organismos, já que são responsáveis por forrageamento e reprodução. Sendo assim é plausível que estas tenham mostrado diferenças nas modificações a fim de maximizar a adaptabilidade dos organismos ao ambiente.

Possivelmente o mecanismo responsável por isso seja mesmo a plasticidade, já que as populações embora apresentem semelhanças, tinham suas modificações associadas ao ambiente. Principalmente quando observamos as populações da Toca do Charco, comparado as populações da Lapa de São Bernardo e a Lapa Zé de Sidnei. As populações que habitavam

o mesmo tipo de habitat eram muito semelhantes morfologicamente quando comparadas a um ambiente distinto, evidenciando uma plasticidade da espécie.

Os resultados desta pesquisa são muito importantes em diversos pontos, primeiro somando conhecimento acerca da ecologia do gênero em caverna. Segundo, para esclarecer como ocorre a adaptação ao meio subterrâneo e quais são as pressões de seleção nestes ambientes. Terceiro, a presença de uma espécie em mais de uma caverna demonstra que ela é capaz de se adaptar a diversos ambientes.

O último ponto é o mais importante para medidas de conservação desta espécie. Algumas cavernas estão sendo impactados por secas dos riachos/cursos d'água que compõem o ambiente, e que até então não ocorria. Isto pode ser de origem antrópica ou não, sendo necessário estudos para a confirmação. A presença de mais de uma população por caverna e sua capacidade de adaptar a diferentes ambientes serve como um “reservatório” de proteção da espécie, que pode ser utilizado para reintrodução em um local em que esta foi extinta.

No futuro, mais pesquisas são necessárias acessar os conhecimentos que não foram contemplados neste projeto. Por exemplo, os aspectos populacionais que podem estar relacionados ao micro-habitat, o tempo de colonização do ambiente, levantamento sobre as cavernas e suas possíveis conexões ou não, e o levantamento genético para avaliar se existe fluxo gênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS-PEREIRA, R.; OLIVEIRA, M. P. A.; FERREIRA, R. L. Anophtalmic and epigeal? Description of an intriguing new species of *Hyaella* (Amphipoda, Hyaellidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 4407, n. 2, p. 254-266, 2018.

BISWAS, J. Kotumsar Cave biodiversity: a review of cavernicoles and their troglobiotic traits. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 1, p. 275, 2010.

BOXSHALL, G.; JAUME, D. Antennules and antennae in the Crustacea. **Funct Morphol Divers**, v. 1, p. 199-236, 2013.

CARDOSO, G. M.; ARAUJO, P.; FERREIRA, R. L. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 3814, n. 3, p. 353-368, 2014.

CHRISTIANSEN, K. Biological processes in space and time: cave life in the light of modern evolutionary theory. The natural history of biospeleology, p. 453-478, 1992.

CULVER, D. C. Analysis of simple cave communities: niche separation and species packing. **Ecology**, v. 51, n. 6, p. 949-958, 1970.

_____. Analysis of simple cave communities. III. Control of abundance. **American Midland Naturalist**, p. 173-187, 1971.

_____. Eye morphometrics of cave and spring populations of *Gammarus minus* (Amphipoda: Gammaridae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 7, n. 1, p. 136-147, 1987.

CULVER, D. C.; KANE, T. C.; FONG, D. W. **Adaptation and natural selection in caves: the evolution of *Gammarus minus***. Harvard University Press, 1995.

CULVER, D.; PIPAN, T. Shifting paradigms of the evolution of cave life. **Acta Carsologica**, v. 44, n. 3, 2016.

CULVER, D. C.; PIPAN, T. Climate, abiotic factors, and the evolution of subterranean life. **Acta Carsologica**, v. 39, n. 3, 2010.

CULVER, D. C.; PIPAN, T. **The biology of caves and other subterranean habitats**. Oxford University Press, 2019.

CULVER, D. C.; HOLSINGER, J. R.; CRHISTMAN, Mary C.; PIPAN, Tanja. Morphological differences among eyeless amphipods in the genus *Stygobromus* dwelling in different subterranean habitats. **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 1, p. 68-74, 2010.

DICKSON, G. W. Behavioral adaptation of the troglobitic amphipod crustacean *Crangonyx antennatus* to stream habitats. **Hydrobiologia**, v. 56, n. 1, p. 17-20, 1977.

DE JONG, G. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. **New Phytologist**, v. 166, n. 1, p. 101-118, 2005.

DELIĆ, T.; TRONTELJ, P.; ZAKŠEK, V.; FIŠER, C. Biotic and abiotic determinants of appendage length evolution in a cave amphipod. **Journal of Zoology**, v. 299, n. 1, p. 42-50, 2016.

FIŠER, C. Adaptation: Morphological. In: **Encyclopedia of Caves**. Academic Press, p. 33-39, 2019.

_____. *Niphargus*: A model system for evolution and ecology. In: **Encyclopedia of Caves**. Elsevier, p. 555-564, 2012

FIŠER, C.; BLEJEC, A.; TRONTELJ, P. Niche-based mechanisms operating within extreme habitats: a case study of subterranean amphipod communities. **Biology Letters**, v. 8, n. 4, p. 578-581, 2012.

FIŠER, C.; ZAGMAJSTER, M.; ZAKŠEK, V. Coevolution of life history traits and morphology in female subterranean amphipods. **Oikos**, v. 122, n. 5, p. 770-778, 2013.

FIŠER, C.; ROBINSON, C. T.; MALARD, F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 3, p. 613-635, 2018.

FONG, D. W. Morphological Evolution of the Amphipod *Gammarus Minus* in Caves: Quantitative Genetic Analysis. **The American Midland Naturalist**, v. 121, n. 2, p. 361–378. 1989.

FONG, D. W. *Gammarus minus*: a model system for the study of adaptation to the cave environment. In: **Encyclopedia of caves**. Academic Press, p. 451-458, 2019.

FONTANIER, M. E.; TOBLER, M. A morphological gradient revisited: cave mollies vary not only in eye size. **Environmental Biology of Fishes**, v. 86, n. 2, p. 285, 2009.

FUSCO, G.; MINELLI, A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. 2010.

GALLÃO, J.; BICHUETTE, M. E. Brazilian obligatory subterranean fauna and threats to the hypogean environment. **ZooKeys**, n. 746, p. 1, 2018.

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. **Extreme environmental change and evolution**. Cambridge University Press, 1997.

HOLSINGER, J. R. Pattern and process in the biogeography of subterranean amphipods. **Hydrobiologia**, v. 287, n. 1, p. 131-145, 1994.

HOWARTH, F. G.; MOLDOVAN, O. T. The ecological classification of cave animals and their adaptations. In: **Cave Ecology**. Springer, Cham, p. 41-67, 2018.

JEFFERY, W. R. Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 25-47, 2009.

JONES, R.; CULVER, D. C. Evidence for selection on sensory structures in a cave population of *Gammarus minus* (Amphipoda). **Evolution**, v. 43, n. 3, p. 688-693, 1989.

JOURDAN, J. et al.. Small-scale phenotypic differentiation along complex stream gradients in a non-native amphipod. **Frontiers in zoology**, v. 16, n. 1, p. 29, 2019.

KRALJ-FIŠER, S. et al. The interplay between habitat use, morphology and locomotion in subterranean crustaceans of the genus *Niphargus*. **Zoology**, p. 125742, 2020.

KOVÁČ, L. Caves as Oligotrophic Ecosystems. In: **Cave Ecology**. Springer, Cham, 2018. p. 297-307.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of statistical software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

METRI, R.; DE OLIVEIRA, A. R.; BAPTISTA-METRI, C. Carapace shape of some aeglid crabs: plasticity at different levels. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 453-459, 2016.

MOHADASI, M.; SHABANIPOUR, N.; EAGDERI, S. Habitat-associated morphological divergence in four Shemaya, *Alburnus chalcoides* (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in the southern Caspian Sea using geometric morphometrics analysis. **International Journal of Aquatic Biology**, v. 1, n. 2, p. 82-92, 2013.

MOLDOVAN, O. T.; MELEG, I; N.; PERȘOIU, A. Habitat fragmentation and its effects on groundwater populations. **Ecohydrology**, v. 5, n. 4, p. 445-452, 2012.

NEUWIRTH, E.; BREWER, R. Color. ColorBrewer palettes. **R package version**, p. 1.1-2, 2014.

PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 9, p. 481-486, 2005.

PIPAN, T.; CULVER, D. C. Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 107, n. 1, p. 1-14, 2012.

PIPAN, T.; CULVER, D. C. The unity and diversity of the subterranean realm with respect to invertebrate body size. **Journal of Caves and Karst Studies**, v. 79, p. 1-9, 2017.

PROTAS, M.; JEFFERY, W. R. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 6, p. 823-845, 2012.

RIESCH, R. et al. Offspring number in a livebearing fish (*Poecilia mexicana*, Poeciliidae): reduced fecundity and reduced plasticity in a population of cave mollies. **Environmental Biology of Fishes**, v. 84, n. 1, p. 89-94, 2009.

RESENDE, L. P. A. et al. Associations between *Emesinae* heteropterans and spiders in limestone caves of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 11, n. 3, p. 114-121, 2016.

RODRIGUES, S. G.; BUENO, A. A. P.; FERREIRA, R. L. The first hypothelminorheic Crustacea (Amphipoda, Dogielinotidae, *Hyaella*) from South America. **Zookeys**, v. 236, p. 65-80, 2012.

ROMERO, A.; GREEN, S. M. The end of regressive evolution: examining and interpreting the evidence from cave fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 1, p. 3-32, 2005.

ROMERO, A. The Evolution of Cave Life: New concepts are challenging conventional ideas about life underground. **American Scientist**, v. 99, n. 2, p. 144-151, 2011.

SECUTTI, S.; BICHUETTE, M. E. Ictiofauna da área cárstica de Presidente Olegário, Estado de Minas Gerais, com ênfase nas espécies subterrâneas. **Revista da Biologia**, v. 10, n. 2, p. 13-20, 2018.

STRONG, D. R. Amphipod amplexus, the significance of ecotypic variation. *Ecology* v. 54, p. 1383-1388, 1972.

SWANSON, G. A. Dissemination of amphipods by waterfowl. **The Journal of wildlife management**, v. 48, n. 3, p. 988-991, 1984.

THIEL, M.; BREITHAUPT, T. Chemical communication in crustaceans: research challenges for the twenty-first century. In: **Chemical communication in crustaceans**. Springer, New York, NY, p. 3-22, 2010.

THORP, J. H.; COVICH, A. P. An overview of freshwater habitats. **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**, 2nd edn. (Eds J. Thorp and AP Covich), p. 19-41, 2001.

TRONTELJ, P.; BLEJEC, A.; FIŠER, C. Ecomorphological convergence of cave communities. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 66, n. 12, p. 3852-3865, 2012.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. *Biologia subterrânea: introdução*. 2006.

TRONTELJ, P.; BLEJEC, A.; FIŠER, C. Ecomorphological Convergence Of Cave Communities. **Evolution**. v. 66, n. 12, p. 3852-3865, 2012.

TURK, S.; SKET, B.; SARBU, S. Comparison between some epigean and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). **Hydrobiologia**, v. 337, n. 1-3, p. 161-170, 1996.

VÄINÖLÄ, R. et al. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. In: **Freshwater animal diversity assessment**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 241-255.

WELLBORN, G. A.; CAPPS, E. Establishment of a new population by a single gravid colonist: implications for *Hyaella* biogeography and speciation. **Evolutionary ecology**, v. 27, n. 1, p. 101-115, 2013.

WELLBORN, G. A. Size-biased predation and prey life histories: a comparative study of freshwater amphipod populations. **Ecology**, v. 75, n. 7, p. 2104-2117, 1994.

WILZBACH, M. A.; CUMMINS, K. W.; KNAPP, R. A. Toward a functional classification of stream invertebrate drift: With 5 figures and 3 tables in the text. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 23, n. 2, p. 1244-1254, 1988.

WICKHAM, H. ggplot2. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180-185, 2011.

ZAKŠEK, V. et al. The limits of cryptic diversity in groundwater phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). **Molecular Ecology**. n. 18, p. 931-946, 2009.