



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM QUATRO FAMÍLIAS DE LYCOSOIDEA  
(ARACHNIDA, ARANEAE), BRASIL**

---

Londrina  
2024



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---



**IDR-Paraná**

Instituto de Desenvolvimento  
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM QUATRO FAMÍLIAS DE LYCOSOIDEA  
(ARACHNIDA, ARANEAE), BRASIL**

---

Londrina  
2024

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM QUATRO FAMÍLIAS DE LYCOSOIDEA  
(ARACHNIDA, ARANEAE), BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda S. de Almeida.

Coorientador: Dr. Matheus Pires Rincão.

Londrina  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C379i Cavenagh, Analiza Fernanda.  
Identificação Molecular e Diversidade Genética em Quatro Famílias de Lycosoidea (Arachnida, Araneae), Brasil. / Analiza Fernanda Cavenagh. - Londrina, 2024.  
139 f.

Orientador: Fernanda Simões Almeida.  
Coorientador: Matheus Pires Rincão.  
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. Genética de Conservação - Tese. 2. Biologia - Tese. 3. Aracnídeos - Tese. 4. Microssatélites - Tese. I. Almeida, Fernanda Simões . II. Rincão, Matheus Pires . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM QUATRO FAMÍLIAS DE LYCOSOIDEA  
(ARACHNIDA, ARANEAE), BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda S. Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lucia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Vera Nisaka Solferini  
Universidade Estadual de Campinas -  
UNICAMP

---

Prof. Dr. Wilson Frantine da Silva  
Universidade Estadual do Norte do Paraná -  
UENP

Londrina, 23 de fevereiro de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – (vigência de abril 2020 a março de 2024). E ao Programa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, que se mostrou presente e incrível em toda essa trajetória.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, sempre me dando força para estar firme diante dos obstáculos e usá-los da melhor maneira para meu crescimento como ser humano.

Agradeço a toda minha família, pelo apoio em cada obstáculo nos anos de doutorado, cada um com sua peculiaridade, se fez presente mesmo quando eu não estava presente, me deram força, amor e tiveram fé que meus passos estavam firmes e no caminho certo.

Um grande agradecimento ao Laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular (LACEM) que foi minha primeira casa na UEL, e mesmo depois continuou me dando o melhor apoio que alguém poderia ter. Em especial aos companheiros diários de trabalho: Jaque, Mari e Thayná que sempre estavam dispostos a me ajudar, muitas vezes ocupados com todos os trabalhos disponibilizavam um tempo para estar ao meu lado me ensinando. Vocês me receberam de braços abertos e podem ter certeza de que estarão comigo para sempre no meu coração, nenhum dia será igual sem cada um de vocês no dia a dia, em novos laboratórios e na vida.

Ao Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) que me recebeu para a o desenvolvimento do Doutorado e abraçou as aranhas comigo, mesmo não sendo objeto de estudo comum deles. Um obrigada especial a cada um: Moema, Karen, Thais e Andrey, e um Obrigada enorme e especial a Camila Savada que sem você Cami, nada nada e nada poderia ter sido feito, me ensinou e reensino tantas técnicas, programas, dicas e o mais importante, Apoio em tudo, dando certo ou errando. Rindo e Desesperando! Obrigada por ser essa pessoa tão especial.

Aquele agradecimento a minha orientadora Dra. Fernanda Simões de Almeida, a Fer, a Chefa! Que não me conhecia e mesmo assim me acolheu em seu laboratório me ensinando além de novas técnicas, se dispôs a unir-se para

o mundo das aranhas juntamente com o Matheus Rincão, onde juntos me mostraram um trabalho em equipe admirável, cobranças sim, mas com objetividade. Obrigada pelo carinho, por todas as correções, dicas e empurrões. Acreditaram em mim quando eu não achei que seria capaz de receber tantas informações e poder trazer os belos frutos que vocês mereciam, espero ter conseguido.

Durante todo o projeto tive muito apoio do grupo ao qual conheci! Dr. Rogério foi um deles, muito essencial no desenvolvimento da Bioinformática. Prestativo, Didático e Pontual e todos os passos.

Aos membros das bancas, que com suas considerações engrandeceram o desenvolvimento deste projeto, mostrando novos caminhos a serem trilhados, e possibilidades de pesquisa que fizeram toda a diferença. Muito Obrigada: Dra. Renata da Rosa, Dra. Ana Lucia Dias, Dra. Vera Solferini, Dr. Wilson Frantine.

A minha amiga-irmã-cérebro, Michele Carina, que sempre me deu força em cada nova etapa, foi e sempre será aquela voz que te anima em momentos de desespero, cansaço e até mesmo nas vontades de desistir. Obrigada por estar na minha vida, e para sempre!

Aos meus amigos de sempre, Tiago Reis, Gustavo Martins, Rhaisa Pereira, Cleiton Bruno, Presley Franco e a família de Cornélio (UENP): Bia, Sandra, Letícia e Gyslaine. Vocês sempre me deram força, independente de tudo, com tudo que tinham, das formas que podiam, fizeram minha caminhada melhor. Em especial a Eloiza que foi um presente que a graduação me deu, minha companheira de comissão de formatura, minha família aqui em Londrina dividindo não só o apartamento e as contas, mas os trancos e barrancos que nos conhecemos. Obrigada por toda força que me deu quando eu mais precisei, sei que posso contar com você sempre e é recíproco, pode ter certeza de que te guardo no meu coração, estamos junto!

Um agradecimento especial aos Mestres que estiveram por toda a trajetória que alcancei da graduação até o doutorado, cada ensinamento foi e sempre será lembrado. Com certeza eu não estaria aqui sem a ajuda e apoio que recebi de cada um.

**Obrigado a todos que de alguma forma  
fizeram parte dessa trajetória!!**

“Palavras são, na minha nada humilde opinião,  
nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de  
formar grandes sofrimentos e de remediá-los”

(Albus Wulfric Percival Brian Dumbledore)

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Tabela 1** – Famílias e espécies analisadas, locais de coleta e número de espécimes. Amostras: ♂ (macho), ♀ (fêmea) e J (juvenil).....41

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1** - Famílias e espécies analisadas. Os números representam a quantidade de espécimes por local de coleta.....66

**Tabela 2** - Distância intraespecífica entre espécies analisadas de Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae. Gp: grupos..... 68

**Tabela 3** - Distância intraespecífica usando os novos conjuntos de espécimes identificados na árvore de Neighbor-Joining (NJ). Gp: grupos.....70

**Tabela 4** - Distâncias interespecíficas parciais de algumas espécies referentes as famílias Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae.....71

**Tabela 5** - Distância interespecífica parcial entre alguns grupos usando os novos conjuntos de espécimes identificados na árvore de Neighbor-joining (NJ). Gp: grupo.....71

**Tabela S1** - Lista das espécies e suas respectivas famílias mostrando a distribuição dos haplótipos gerais do grupo total e suas localidades - Parque Estadual do Guartelá (PEG) – Tibagi, Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG) – Londrina, Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) – Ponta Grossa, Parque Municipal Arthur Thomas (PMAT) – Londrina, Parque Nacional do Iguaçu (PNI) – Foz do Iguaçu, Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) – Icaraíma, Parque Nacional de Superagui (PNS) – Guaraqueçaba, Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (PNSH) – Matinhos, Reserva Biológica das Perobas (RBP) – Tuneiras do Oeste e Reserva Fazenda Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS) - Santo Antônio da Platina.....85

**Tabela S2** - Distância interespecífica entre os grupos de espécies analisadas de Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae. Gp: grupo; GE: grupo externo.....90

**Tabela S3** - Distância interespecífica entre os grupos usando os novos conjuntos de espécimes identificados na árvore de Neighbor-joining (NJ). Gp: grupo; GE: grupo externo.....93

**Tabela S4** – Grupos formados pela divisão de ramos da árvore de Neighbor-Joining (NJ) segundo as análises geradas no modelo de Kimura-2-Parâmetros (KP2) .....100

## CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros da montagem do genoma de <i>Ctenus ornatus</i> .....	107
<b>Tabela 2</b> - Descrição de oito <i>primers</i> para <i>loci</i> microssatélites isolados de <i>Ctenus ornatus</i> .....	110
<b>Tabela 3</b> - Amplificação cruzada dos oito <i>primers</i> microssatélites em oito espécies da família Ctenidae e uma da família Lycosidae.....	112

## CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b> - Lista com os locais de coleta de <i>Ctenus ornatus</i> nas Unidades de Conservação (UCs) do estado do Paraná, Brasil. POP: população, N: número de indivíduos coletados .....	121
<b>Tabela 2</b> - <i>Primers</i> microssatélites desenvolvidos de <i>Ctenus ornatus</i> .....	122
<b>Tabela 3</b> - Diversidade genética de <i>Ctenus ornatus</i> , obtida a partir de marcadores microssatélites. N: número de indivíduos analisados; A: número total de alelos; $N_A$ : número médio de alelos; $N_E$ : número de alelos efetivos; $N_P$ : número de alelos privados; $H_O$ : Heterozigosidade observada; $H_E$ : Heterozigosidade esperada; $F_{IS}$ : índice de fixação dentro das populações.....	124
<b>Tabela 4</b> - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de <i>Ctenus ornatus</i> das quatro populações estudadas, mostrando a porcentagem de variação entre populações, entre os indivíduos das populações e dentro dos indivíduos.....	126
<b>Tabela 5</b> - Valores de $F_{ST}$ par a par entre as populações de <i>C. ornatus</i> .....	127
<b>Tabela 6</b> - Matriz de distância genética (DG) e identidade genética (IG) de Nei (distância genética de Nei abaixo a diagonal e identidade genética sobre a diagonal) .....	127
<b>Tabela S1</b> – – Estimativas do Equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) nas populações por <i>loci</i> , com as correções de Bonferroni ( $\alpha/(n-i+1)$ ) .....	136
<b>Tabela S2</b> – - Estatística $F$ sobre todas as populações para cada locus.....	136
<b>Tabela S3</b> - Frequência de alelos privados amostrados nas quatro populações de <i>Ctenus ornatus</i> , de um total de 105 alelos, por meio de cinco <i>loci</i> microssatélites.....	137

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** - Esquema representando um cladograma simplificado da ordem Araneae, mostrando as relações filogenéticas dentro do grupo e os principais caracteres que distinguem tais grupos. ....21
- Figura 2** - Representação do arranjo ocular do tipo 2-4-2 que suporta a monofilia de Ctenidae, disposição dos oito olhos em três fileiras e foto de um exemplar da família Ctenidae.....24
- Figura 3** - Exemplar de Ctenidae (*Guasuctenus longipes* (Keyserling, 1891)) ..25
- Figura 4** - Disposição em fileiras do padrão ocular do tipo 4-2-2, caractere importante na identificação de espécies, e foto de exemplar de Lycosidae.....26
- Figura 5** - Exemplar de Lycosidae (*Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836), sendo possível observar variação de cor.....27
- Figura 6** – Exemplares de Thomisidae, evidenciando as variáveis de coloração do grupo.....28
- Figura 7** – Caractere de identificação de Thomisidae: disposição ocular do tipo 4-4 com olhos laterais maiores e dispostos em saliência, e foto de exemplar da família.....29
- Figura 8** – Disposição dos olhos em Trechaleidae padrão 4-4, característica marcante de definição de grupo, e foto de um exemplar da família.....30
- Figura 9** – Fotos de exemplares da família Trechaleidae.....31
- Figura 10** - Mapa do Brasil com indicação do estado do Paraná apresentando os pontos de coleta. Pontos de localização, demarcam as Unidades de Conservação e seus respectivos municípios. A legenda identifica no mapa os diferentes ecossistemas que compõem os habitats do estado.....40

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Árvore de inferência Neighbor-Joining (NJ) composta pelos 140 indivíduos representando as quatro famílias (Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae); o ramo em branco mostra o grupo externo (GE) *Dolomedes angustivirgatus* - GACS6193-19, Psauridae), mostrando a distribuição dos espécimes em cada ramo segundo as análises geradas no modelo genético de Kimura 2 Parâmetros (KP2) .....69

**Figura 2** - Árvore Neighbor-Joining (NJ) colapsada, usada como árvore resumo para identificação dos grupos apresentados aos espécimes previamente definidos por identificação morfológica e divididos em novos grupos relacionados ao teste de distância intraespecífica pelo método de Kimura-2-Parâmetros (KP2) – apoio a Tabela S4.....75

**Figura 3** - Divergência genética pareada e delimitação de espécies em famílias de Lycosoidea: **(A)** - histograma mostrando a distribuição de divergências genéticas pareadas para sequências COI de Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae; **(B)** – distribuição das diferenças ordenadas aos pares calculadas com ABGD; a linha vermelha indica a frequência acumulada dos valores de distância delimitados com ABGD ( $p$ -distâncias não corrigidas) .....76

**Figura S1** – Rede de Haplótipos composta pelos 140 indivíduos representando as quatro famílias (Ctenidae - rosa, Lycosidae - azul, Thomisidae - amarelo e Trechaleidae – verde), mostrando a distribuição dos 72 haplótipos. As variadas métricas dos círculos representam a quantidade de indivíduos que possuem aquele haplótipo (variando de 1 a 8 indivíduos – apoio a Tabela S1); os losangos vermelhos indicam os haplótipos intermediários não amostrados neste trabalho.....84

### CAPÍTULO 3

**Figura 1** - Mapa do Brasil com indicação do estado do Paraná apresentando os pontos de coleta. Os pontos de localização enumerados demarcam as Unidades de Conservação. A legenda identifica no mapa os diferentes ecossistemas que compõem os habitats do estado .....121

**Figura 2** - Frequência de alelos privados amostrados nas quatro populações de *Ctenus ornatus*, de um total de 105 alelos, por meio de cinco *loci* microssatélites. Eixo x: os alelos; y: a frequência em sua população .....125

**Figura 3** – **(A)** Estimativa do número de agrupamento ( $K$ ) a partir de estatística  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005). **(B)** Representação gráfica do agrupamento bayesiano ( $K=2$ ), gerado a partir de seis *loci* de microssatélites para os quatro pontos analisados de *Ctenus ornatus*. PEVV: Parque Estadual de Vila Velha; PEMG: Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS: Parque Nacional do Superagui; PNI: Parque Nacional do Iguaçu .....129

**Figura S1** - Frequências dos alelos por loco microssatélite de *C. ornatus* para os quatro pontos estudados .....134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
ASAP	Assemble Species by Automatic Partitioning
BI	Bayesiana
bPTP	Bayesian Poisson Tree Processes
COI	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
GAP	Intervalos
GMYC	Generalized Mixed Yule Coalescence
HAP	Haplótipo
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
KP2	Kimura-2-Parâmetros
MOTU	Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares
mPTP	Poisson Tree Process Method
ML	Máxima Verossimilhança
NaCl	Cloreto de Sódio
NJ	Neighbor-Joining
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Parque Estadual do Guartelá
PEMG	Parque Estadual Mata do Godoy
PEVV	Parque Estadual Vila Velha

PMAT	Parque Municipal Arthur Thomas
PNI	Parque Nacional do Iguaçu
PNIG	Parque Nacional de Ilha Grande
PNS	Parque Nacional do Superagui
PNSH	Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange
RBP	Reserva Biológica das Perobas
RFPS	Reserva Fazenda Nossa Senhora do Perpétuo Socorro
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STRs	Short Tandem Repeats
TE	Tampão de Estoque
UC	Unidades de Conservação
UEL	Universidade Estadual de Londrina

CAVENAGH, A. F. **Identificação Molecular e Diversidade Genética em Quatro Famílias de Lycosoidea (Arachnida, Araneae), Brasil.** 2024. 139 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO

Este estudo investiga a diversidade genética e estrutura populacional de aranhas em Unidades de Conservação do Paraná, utilizando ferramentas moleculares como sequenciamento de DNA mitocondrial e desenvolvimento de primers microssatélites. Através da análise de 148 indivíduos de 16 espécies, foi identificado 26 grupos de indivíduos e Unidades Evolutivamente Significantes. Para a espécie *Ctenus ornatus*, foram desenvolvidos oito primers microssatélites e analisados 110 indivíduos em 6 populações, encontrando menor diversidade genética na população do Parque Estadual de Vila Velha. Os resultados sugerem que o isolamento por distância não é o único fator que estrutura as populações, e que a atividade antrópica pode afetar a variabilidade genética de algumas espécies. Os estudos moleculares fornecem informações valiosas para o manejo e conservação de aranhas em Unidades de Conservação.

**Palavras-chave:** aranha; DNA mitocondrial; diversidade genética; microssatélite; transferabilidade.

CAVENAGH, A. F. **Molecular Identification and Genetic Diversity in Four Families of Lycosoidea (Arachnida, Araneae), Brazil.** 2024. 139 f. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) - Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2024.

## **ABSTRACT**

This study investigates the genetic diversity and population structure of spiders in Conservation Units (CUs) of Paraná, Brazil, using molecular tools such as mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing and microsatellite primer development. We analyzed 148 individuals from 16 species and identified 26 groups of individuals and Evolutionary Significant Units (ESUs). For the species *Ctenus ornatus*, we developed eight microsatellite primers and analyzed 110 individuals in six populations, finding lower genetic diversity in the population of Vila Velha State Park. The results suggest that isolation by distance is not the only factor that structures the populations, and that anthropogenic activity can affect the genetic variability of some species. We conclude that molecular studies provide valuable information for the management and conservation of spiders in CUs.

**Keywords:** spider; mitochondrial DNA; genetical diversity; microsatellite; transferability.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
2.1	ARANEAE E LYCOSOIDEA .....	21
2.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DAS FAMÍLIAS CTENIDAE, LYCOSIDAE, THOMISIDAE E TRECHALEIDAE .....	23
2.3.1	<i>Ctenidae</i> Keyserling, 1877 .....	23
2.3.2	<i>Lycosidae</i> Sundevall, 1833 .....	25
2.3.3	<i>Thomisidae</i> Sundevall, 1833 .....	27
2.3.4	<i>Trechaleidae</i> Simon, 1890 .....	29
2.3	UNIDADES DE CONSERVAÇÃO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO DAS ARANHAS .....	31
2.4	O USO DOS MARCADORES MOLECULARES PARA A CONSERVAÇÃO DAS ARANHAS .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	MATERIAL .....	39
4.2	MÉTODOS .....	42
4.2.1	<i>Extração do DNA Genômico</i> .....	42
4.2.2	<i>Amplificação do Gene Mitocondrial COI</i> .....	43
4.2.3	<i>Sequenciamento de DNA total e Montagem do genoma</i> .....	45
4.2.4	<i>Produção dos primers microssatélites e Caracterização da variabilidade genética</i> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>60</b>
	IDENTIFICAÇÃO DE ARANHAS LYCOSOIDEA COM USO DO GENE COI: Diversidade de espécies em análises de agrupamento	
	<b>RESUMO</b> .....	<b>61</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>62</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
	ANÁLISE DE LIMIAR DE DELIMITAÇÃO E HAPLOTIPAGEM .....	67
	ANÁLISE DE ÁRVORES E ESTIMATIVA DE MOTU'S .....	73
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>

<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>102</b>
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>LOCi</i> MICROSSATÉLITES EM <i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877) (LYCOSOIDEA: CTENIDAE)	
<b>RESUMO.....</b>	<b>103</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO ILLUMINA.....	105
MONTAGEM DO GENOMA DE <i>CTENUS ORNATUS</i> .....	105
SELEÇÃO E DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> .....	105
TESTES DE TRANSFERABILIDADE .....	106
CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA .....	106
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>107</b>
MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE <i>CTENUS ORNATUS</i> .....	107
SELEÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> E ANÁLISE POPULACIONAL.....	108
TESTE DE TRANSFERABILIDADE .....	111
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>117</b>
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE <i>Ctenus ornatus</i> (LYCOSOIDEA: CTENIDAE) EM ÁREAS DE PRESERVAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA	
<b>RESUMO.....</b>	<b>118</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>120</b>
COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA .....	120
PROTOCOLO MOLECULAR .....	121
ANÁLISES GENÉTICA POPULACIONAL .....	122
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
DIVERSIDADE GENÉTICA .....	123
ESTRUTURA GENÉTICA .....	126
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>130</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>130</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>134</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>138</b>

# 1 INTRODUÇÃO

2

3 As aranhas Lycosoidea representam uma das superfamílias mais diversas  
4 de aracnídeos, com aproximadamente 6.251 espécies em sete famílias:  
5 Ctenidae, Lycosidae, Oxyopidae, Pisauridae, Psechridae, Thomisidae e  
6 Trechaleidae (Polotow et al., 2015; Wheeler et al., 2016; World Spider Catalog,  
7 2024). Esse grupo se destaca por sua ampla distribuição em quase todos os  
8 ecossistemas, ocupando diversos nichos ecológicos e desempenhando funções  
9 importantes no controle de populações de insetos (Foelix, 2011).

10 Muitos estudos relacionados às aranhas estão associados à sua  
11 importância médica, como análises químicas do veneno de algumas espécies,  
12 principalmente em representantes de Ctenidae e Lycosidae (Foelix, 2011;  
13 Hauke; Herzing, 2017; Rueda; Realpe; Uribe, 2017; Schmidt, 2019). Contudo,  
14 considerando também que as aranhas são predadoras de topo de cadeia, elas  
15 são reguladoras das populações de insetos que atuam não só na decomposição  
16 da matéria orgânica, mas também de outros processos biológicos consideráveis  
17 na manutenção dos ambientes naturais como polinização, herbivoria, dentre  
18 outros (Francisco, 2011).

19 Apesar dos esforços crescentes nas últimas duas décadas, as aranhas  
20 ainda são um grupo de animais muito carentes de estudo, tanto no que se refere  
21 à caracterização etológica quanto em relação à revisão taxonômica e descrição  
22 de espécies. Nesse sentido, muitas espécies necessitam de análises mais  
23 eficazes em relação à identificação, seja para estudos populacionais, de  
24 bioindicadores, ou agentes de controle biológico em agro-ecossistemas  
25 (Francisco, 2011; Peres et al., 2010).

26 O uso de métodos moleculares é de grande relevância nestas situações,  
27 incluindo o sequenciamento de trechos do DNA mitocondrial (DNAMt). A  
28 exemplo disso Macrini et al. (2015) evidenciaram a diversidade críptica em  
29 *Aglaoctenus lagotis* (Holmberg, 1876). A dificuldade de estabelecer  
30 identificações morfológicas concretas muitas vezes, é mais evidente em alguns  
31 grupos, como Lycosidae, em que evidências sugerem que diversos gêneros  
32 encontrados na América do Sul precisam ser revistos (Chemisquy et al., 2008).

1 Além de estar relacionado aos estudos de identificação molecular, o gene  
2 do DNAm<sub>t</sub>, citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), é também amplamente  
3 utilizado em estudos evolutivos, já que sua origem remota à história dos  
4 primeiros organismos eucarióticos e raramente apresenta inserções e deleções,  
5 o que o torna uma boa ferramenta para análises comparativas (Barret; Hebert,  
6 2005). Hebert et al. (2003) observaram que a evolução desse gene era rápida o  
7 bastante para auxiliar não só na discriminação de espécies, mas de grupos  
8 dentro de uma espécie, o que trouxe popularidade para este tipo de análise.

9 Delimitar corretamente as espécies resolve apenas uma das lacunas no  
10 conhecimento biológico sobre as aranhas. Outro aspecto importante está  
11 relacionado com o conhecimento a certa da estrutura que as populações dessas  
12 espécies possuem atualmente. Isso pode ajudar em diferentes estratégias tanto  
13 para pesquisas a cerca desses organismos quanto para ações que visem sua  
14 conservação. O uso de outros marcadores moleculares tem sido uma das  
15 principais abordagens na obtenção de informações genéticas para populações  
16 naturais (Solé-Cava et al., 2012).

17 Dentre esses marcadores destacam-se os microssatélites, principalmente  
18 por serem altamente polimórficos e não estarem sob efeito de forças evolutivas  
19 (Turchetto-Zolet et al., 2017). Esses marcadores permitem uma avaliação da  
20 diversidade genética livre de influências do ambiente ou do estágio de  
21 desenvolvimento do organismo analisado (Lacerda et al., 2002).

22 O uso dos algoritmos de delimitação de espécies aplicadas às sequências  
23 do gene COI unidos aos estudos da diversidade e estruturação genética  
24 baseados nas regiões microssatélites, podem proporcionar informações precisas  
25 sobre limites de espécies dentro de certos grupos taxonômicos. Com potencial  
26 de promover meios rápidos e eficientes para delinear e identificar populações e  
27 espécies em Lycosoidea. Diante disto, o presente estudo amplia de maneira  
28 significativa o nível de conhecimento sobre diversas espécies de Lycosoidea,  
29 fortalece a ideia de que a genética molecular é forte aliada no processo de  
30 delimitação de espécies e fornece ferramentas para futuros trabalhos que  
31 tenham por intuito aprofundar o conhecimento nesse grupo taxonômico e nas  
32 dinâmicas das populações das espécies aqui analisadas.

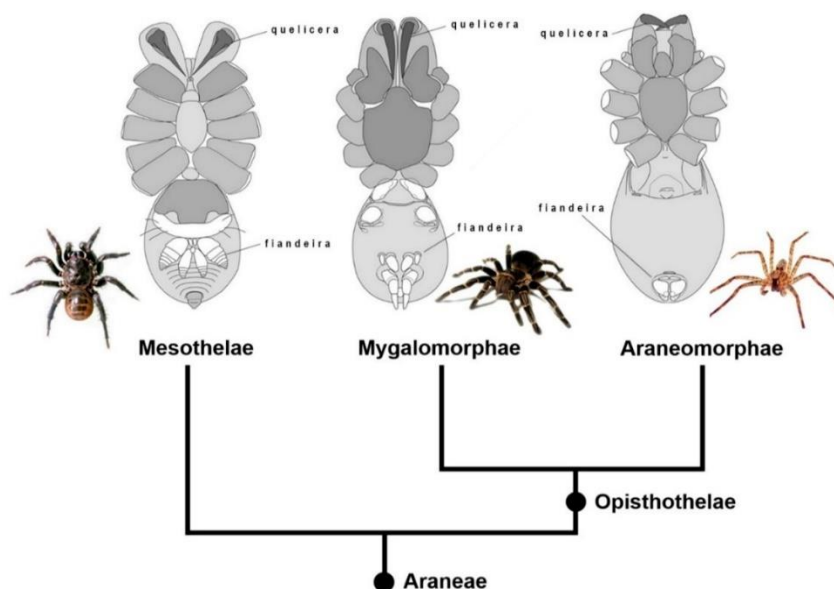
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ARANEAE E LYCOSOIDEA

Para a ordem das aranhas (Araneae) são descritas aproximadamente 52 mil espécies, sendo esta considerada uma das ordens de maior diversidade e dispersão. É um grupo que possui uma divisão há muito tempo estruturada, sendo representada por duas subordens: Mesothelae caracterizada pela posição das fiandeiras na região mediana do abdômen; e Opisthothelae possuindo esta condição na posição terminal (**Figura 1**) (Wheeler et al., 2016).

A subordem Opisthothelae sofre uma segunda divisão, que são as duas infraordens (**Figura 1**): Mygalomorphae que compreende todas as espécies de tarântulas, caracterizadas pelo alinhamento paralelo das quelíceras; e Araneomorphae onde estão inseridas 90% das espécies de aranhas descritas, caracterizadas por quelíceras opostas uma à outra (Coddington; Levi, 1991; Foelix, 2011; Wheeler et al., 2016).

**Figura 1** - Esquema representando um cladograma simplificado da ordem Araneae, mostrando as relações filogenéticas dentro do grupo e os principais caracteres que distinguem tais grupos. Mesothelae – fiandeira proximal; Mygalomorphae- fiandeira distal e quelíceras paralelas; Araneomorphae: fiandeira distal e quelíceras opostas.



21

22 **Fonte:** Fotos - S. Scharf (InBioVeritas); Schwendinger, 2017; www.nicepng; www.spider-  
 23 transparent-clear-leg, adaptado por Mariana Costa Terra (2019) relacionado a filogenia de  
 24 Wheeler et al., 2016.

1           Dentre a infra ordem Araneomorphae, está a superfamília Lycosoidea,  
2 composta por sete famílias com 6.251 espécies. Neste grupo encontram-se as  
3 quatro famílias de interesse deste estudo: Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e  
4 Trechaleidae (Polotow; Carmichael; Griswold, 2015; Wheeler et al., 2016; World  
5 Spider Catalog, 2024).

6           Um dos caracteres mais importantes para classificação das famílias de  
7 aranhas são os olhos, principalmente seu tamanho, posicionamento, quantidade  
8 *tapetum* - membrana posicionada no globo ocular que faz com que os animais  
9 tenham uma melhor visão em baixa luminosidade, permitindo também, que os  
10 olhos reflitam ao contato direto com a luz, o que auxilia sua identificação na  
11 coleta. No caso de Lycosoidea essa membrana é em forma de grade, entretanto,  
12 não é uma característica exclusiva dessa superfamília. A ausência de  
13 apomorfias facilmente detectáveis (ex. sobreposição da morfologia do *tapetum*)  
14 tem motivado estudos moleculares visando a melhor compreensão das relações  
15 filogenéticas do grupo. Contudo, ainda são escassos e tem muito a contribuir  
16 com a área (Foelix, 2011).

17           Filogenias com dados moleculares tem sido empregada no estudo de  
18 várias famílias de Lycosoidea (Albo et al., 2017; Benjamin et al., 2008; Polotow;  
19 Carmichael; Griswold, 2015; Sirvid et al., 2013), envolvendo dados originados de  
20 fontes diversas como composição proteica da seda (Pouchkina-Stantcheva;  
21 Mcqueen-Mason, 2004) e análise de toxicidade do veneno (Hauke; Herzing,  
22 2017; Rueda; Realpe; Uribe, 2017; Schmidt, 2019).

23           No que tange o aspecto conservação, pouco se sabe sobre esse grupo  
24 tão diverso de organismos. Espécies de Lycosidae já foram estudadas em  
25 trabalhos de Macrini et al. (2015), Tanikawa et al. (2018) e Krehenwinkel et al.  
26 (2019); Thomisidae e Trechaleidae também possuem alguns estudos  
27 populacionais com os trabalhos de Sirvid et al. (2013), Akipinar e Mammadova  
28 (2020) e Da-Silveira e Bonatto (2009); já Ctenidae conta apenas com dados  
29 publicados por Salgado-Roa et al. (2021).

30

31

## 2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DAS FAMÍLIAS CTENIDAE, LYCOSIDAE, THOMISIDAE E TRECHALEIDAE

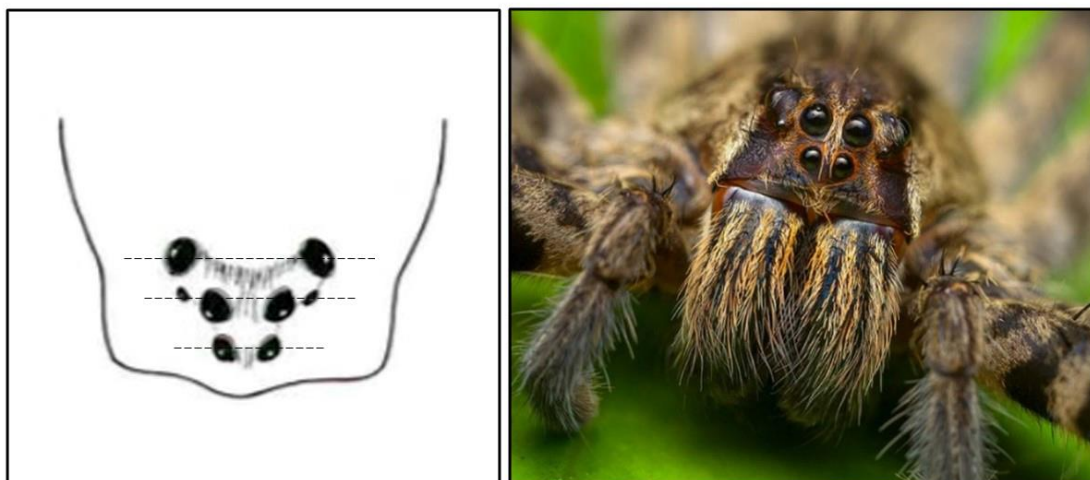
### 2.3.1 Ctenidae Keyserling, 1877

Ctenidae é um grupo considerado monofilético possuindo uma distribuição de 603 espécies agrupadas em 48 gêneros (Jocqué; Dippenar-Schoeman; Zoologin, 2006; World Spider Catalog, 2024). É uma família de espécies de pequeno a grande porte, sendo composta por indivíduos que podem chegar a 20 centímetros de comprimento considerando a extensão das pernas. São caçadoras ativas, de hábito noturno e errantes, possuem uma alimentação exclusivamente carnívora (Foelix, 2011; Gonzaga; Santos; Japyassú, 2007; Jocqué; Dippenar-Schoeman; Zoologin, 2006; Polotow; Brescovit, 2014).

Conhecidas como “tropical wolf spiders” (Lucas 1988), não possuem um nome popular que englobe o grupo como um todo no Brasil, salvo exceção das espécies conhecidas como “armadeiras”, que pertencem ao gênero *Phoneutria*. Ctenidae é muito abundante no continente Sul-Americano, mas seus gêneros são dispersos por toda região tropical do planeta (World Spider Catalog, 2024).

O padrão ocular observado em Ctenidae é de oito olhos em formação do tipo 2-4-2 (**Figura 2**), sendo esta uma das características utilizadas como representação de grupo monofilético. Outros pontos que devem ser analisados com precisão são as estruturas genitais, fiandeiras, quelíceras e garras tarsais, importantes também para a classificação a nível de espécie (Foelix, 2011; Jocqué; Dippenar-Schoeman; Zoologin, 2006; Silva-Dávila, 2003).

- 1 **Figura 2** – Representação do arranjo ocular do tipo 2-4-2 que suporta a monofilia  
 2 de Ctenidae, disposição dos oito olhos em três fileiras e foto de um exemplar da  
 3 família Ctenidae.



4  
 5  
 6  
 7

**Fonte:** SILVA-DÁVILA, 2003; JOCQUÉ; DIPPENAR-SCHOEMAN; ZOOLOGIN, 2006 - Foto: Jocqué; Dippenar-Schoeman; Zoologin, 2006 e Thomas Shahan.

8           Membros da família Ctenidae, além de sua importância médica, também  
 9 vem recebendo grande interesse por sua capacidade de bioindicador de  
 10 qualidade ambiental, já que são mais exigentes quanto as condições do habitat  
 11 e mais vulneráveis a alterações na estrutura da vegetação (Mestre; Gasnier,  
 12 2008; Rego et al., 2005).

13           Com relação ao ponto de vista socioeconômico, espécies do gênero  
 14 *Phoneutria* Perty, 1833, por exemplo, são caracterizadas por serem agressivas  
 15 e venenosas, um dos grupos que mais provocam acidentes no Brasil. Entretanto,  
 16 são aranhas de importância médica devido ao efeito altamente neurotóxico de  
 17 seu veneno (Foelix, 2011; Hazzi et al., 2018). Além disso, o veneno das espécies  
 18 do gênero tem uma composição relacionada a ativos biológicos que são  
 19 interessantes para o desenvolvimento de medicamentos e bioinseticidas  
 20 (Peigneur; De Lima; Tytgatj, 2018).

21           Muitas espécies de Ctenidae (**Figura 3**), estão associadas diretamente  
 22 a um ambiente de mata preservada, pelo fato de possuir grupos arborícolas,  
 23 contudo, a família possui muitas espécies de característica errante, sem uma  
 24 residência fixa (Foelix, 2011; Polotow; Brescovit, 2014).

25

1 **Figura 3** – Exemplar de Ctenidae (*Guasuctenus longipes* (Keyserling, 1891)).



2

3 **Fonte:** Matheus Pires Rincão (2018 – 2020).

#### 4 2.3.2 Lycosidae Sundevall, 1833

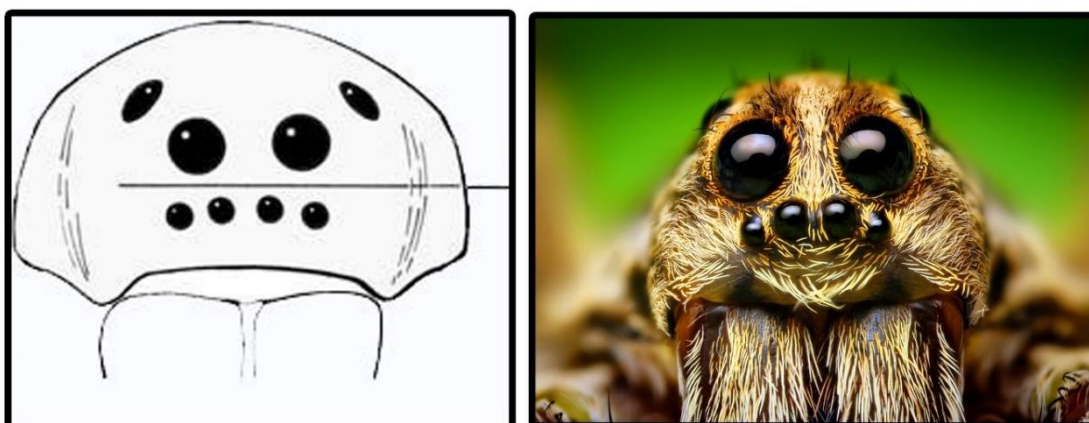
5 As aranhas-lobo, nome comum para os membros da família Lycosidae,  
6 são ótimas caçadoras e muito ágeis, sendo muito importante em papéis de  
7 controle biológico, como predadores de pragas agrícolas, onde são muito  
8 observadas (agro-ecossistemas) e economicamente importantes (Mestre;  
9 Gasnier, 2008; Rego et al., 2005).

10 São também consideradas como organismos modelos em relações  
11 ecológicas e de comportamento (De Almeida et al., 2010; Hoefler et al., 2008;  
12 Stratton; Uetz, 1983; Wilder; Rypstra, 2010), no controle das comunidades  
13 terrestres através da predação e em estudos da composição do veneno  
14 examinando os transcritos expressos por essas glândulas e desenvolvendo  
15 marcadores (Zhang et al., 2010).

16 É um grupo composto por 2.466 espécies que se distribuem em 132  
17 gêneros (World Spider Catalog, 2024). Lycosidae abriga espécies que podem  
18 chegar a 5 centímetros levando em consideração a extensão das pernas, e  
19 frequentemente, as fêmeas são maiores que os machos. São aranhas cujo  
20 comportamento errante predomina, embora dois gêneros apresentem hábito  
21 mais sedentário, utilizando teias como método de captura de presas, como as  
22 espécies do gênero *Aglaoctenus* Tullgren, 1905 (Foelix, 2011).

1 São animais de hábito noturno, que possuem cuidado parental e praticam  
2 a construção de abrigos subterrâneos, podendo também fazer abrigos paralelos  
3 à superfície; durante a captura de presas, tendem a reagir principalmente às  
4 vibrações causadas pela batida das asas ou pelo padrão característico de  
5 caminhada dos insetos; possuem um arranjo ocular composto por oito olhos  
6 dispostos em um padrão do tipo 4-2-2 (**Figura 4**) (Foelix, 2011).

7 **Figura 4** – Disposição em fileiras do padrão ocular do tipo 4-2-2, caractere  
8 importante na identificação de espécies, e foto de exemplar de Lycosidae



9

10 **Fonte:** Foelix, 2011 – imagem adaptada com foto de João P. Burini – PrimalShutter.

11

12 De acordo com Foelix (2011), a morfologia e comportamento de  
13 Lycosidae são características importantes para que ela possa ser diferenciada  
14 de outras famílias, incluindo: variação de cores sobre o cefalotórax e abdômen,  
15 a qual forma um desenho parecido com uma seta (**Figura 5**). A utilização da  
16 técnica de ficar à espreita para capturar sua presa deu às aranhas dessa família  
17 o nome de aranhas lobo, pois apesar de possuírem as glândulas de seda,  
18 geralmente não confeccionam teias para esta finalidade.

- 1 **Figura 5** - Exemplar de Lycosidae (*Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836), sendo  
2 possível observar variação de cor.



- 3 **Fonte:** Matheus Pires Rincão (2020).

4       Espécies de Lycosidae são capazes de colonizar ambientes mais  
5 ríspidos, como os agro-ecossistemas, conseguindo se adaptar melhor aos  
6 habitats antropicamente modificados. É uma família recente, e se comparada  
7 com outros grupos, e sua origem e diversificação parece estar muito associada  
8 com a história evolutiva das gramíneas. De modo que são muito adaptadas a  
9 esse tipo de ambiente, e por sua vez sua história recente com adaptações a  
10 habitats muito similares possa ter favorecido a manutenção de certas  
11 características morfológicas, levando a uma problemática para sistemas de  
12 taxonomia baseados exclusivamente em morfologia (Albo et al., 2017; Piacentini;  
13 Ramírez, 2019; Wheeler et al., 2016).

#### 14                   2.3.3 Thomisidae Sundevall, 1833

15       Thomisidae, são conhecidas como aranha caranguejo, devido a sua alta  
16 capacidade de locomoção lateral e a proporção dos dois conjuntos de pernas  
17 dianteiras serem bem maiores que as demais. Possui 2.170 espécies que se  
18 dividem entre 171 gêneros, é a segunda família com maior número de espécies  
19 dentro de Lycosoidea, perdendo apenas para Lycosidae (Foelix, 2011; World  
20 Spider Catalog, 2024).

21       São espécies pequenas de dois centímetros de comprimento; errantes e  
22 que não produzem teia, capturam suas presas por modo de emboscada sob  
23 folhas e flores. As aranhas caranguejo possuem espécies altamente coloridas

1 de tons amarelos brilhantes e verde (**Figura 6**), mas também podem apresentar  
2 padrões de cores semelhantes à cascas de árvores, ambos proporcionam a  
3 possibilidade de se camuflar na vegetação, o que, juntamente a um veneno  
4 altamente eficaz contra insetos favorece ataques contra presas maiores (Rocha-  
5 Filho; Rinaldi, 2011; Vieira; Gonzaga, 2017).

6 **Figura 6** – Exemplos de Thomisidae, evidenciando as variáveis de coloração  
7 do grupo.



8 **Fonte:** João Burini (<https://www.primals shutter.com/>) – (2023) e Matheus Pires Rincão (2020).

9 O valor econômico de Thomisidae está ligado ao seu habitat e na prática  
10 de uso como controle biológico, já que são predadoras de pragas agrícolas  
11 (Nyffeler; Benz, 1987; Riechert; Lockley, 1984; Uetz et al., 1999). Possuem os  
12 olhos dispostos em duas fileiras transversais um pouco curvas, sendo os centrais  
13 pouco menores e os laterais situados em saliências tuberculiformes,  
14 evidenciando um padrão do tipo 4-4 (**Figura 7**). Além disso, ao contrário de  
15 Ctenidae e Lycosidae, Thomisidae apresenta preferencialmente hábitos diurnos  
16 (Foelix, 2011).

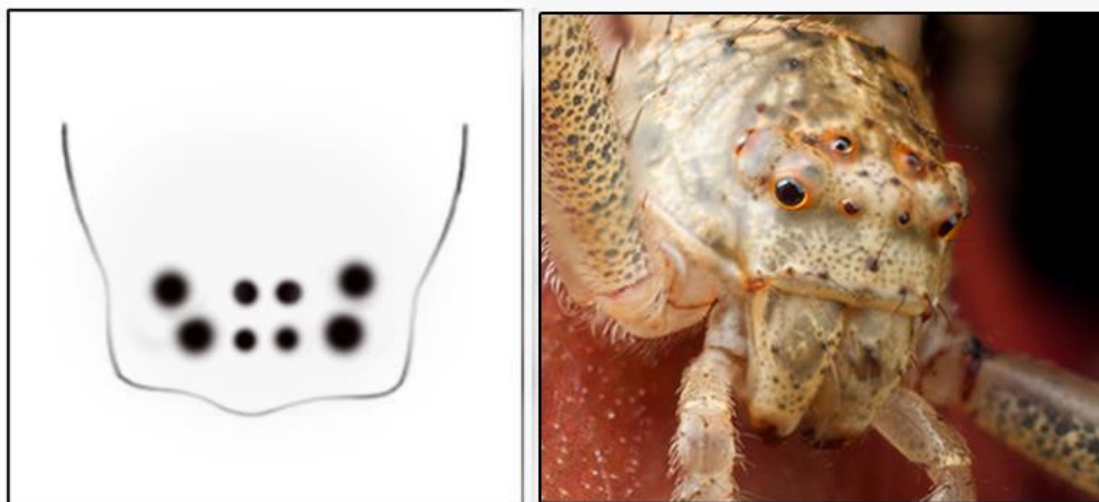
17

18

19

20

- 1 **Figura 7** – Caractere de identificação de Thomisidae: disposição ocular do tipo  
2 4-4 com olhos laterais maiores e dispostos em saliência, e foto de exemplar da  
3 família.



4  
5 **Fonte:** Foelix, 2011 – imagem adaptada pelo autor com foto de João P. Burini – PrimalShutter.  
6

7 De acordo com alguns autores, as aranhas caranguejo são mais diversas  
8 em áreas intemperadas, subtropicais e tropicais, como as dos ecossistemas do  
9 Cerrado (Gonzaga et al., 2007; Schick, 1965), um dos principais *hotspots* de  
10 diversidade do Brasil (Orme et al., 2005).

11 Rocha-Filho e Rinaldi (2011), observaram que um conjunto de flores  
12 dispostos em uma planta pode ter relação com a presença das espécies de  
13 Thomisidae, fato este ligado a quantidade de flores e suas características que  
14 influenciam diretamente na abundância de insetos visitantes, o que fundamenta  
15 a escolha dos locais de caça dessas aranhas (Bernays; Chapman, 1994; Greco;  
16 Kevan, 1994).

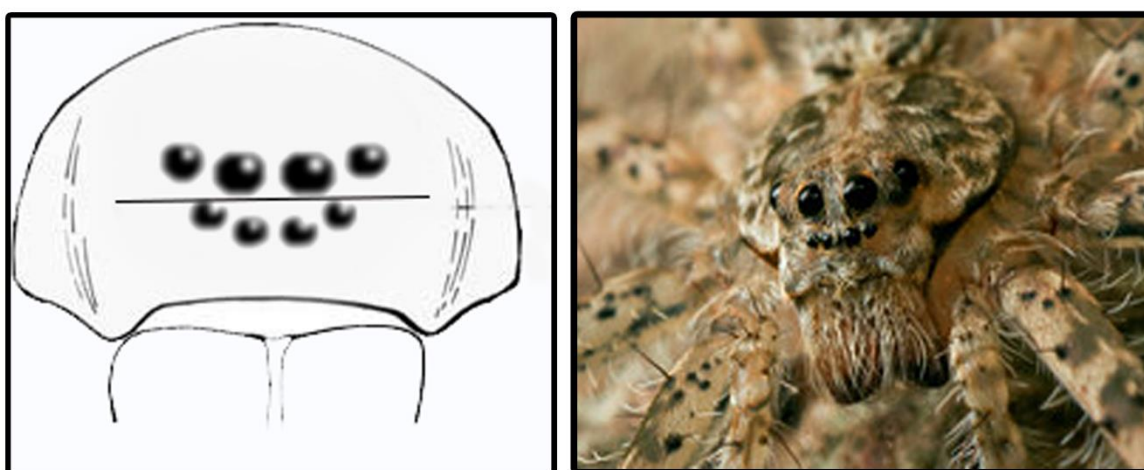
#### 17 2.3.4 Trechaleidae Simon, 1890

18 As aranhas aquáticas de pernas longas, como são chamados os  
19 indivíduos de Trechaleidae, compõem uma família pequena e pouco estudada  
20 de 133 espécies divididas em 17 gêneros (World Spider Catalog, 2024), apesar  
21 do nome popular as espécies brasileiras são todas semiaquáticas. É um grupo  
22 muito próximo filogeneticamente de Lycosidae, contudo divide características  
23 também com Pisauridae.

1 Possuem preferência por habitats de água corrente, geralmente em  
2 fendas de rochas e cachoeiras; têm a habilidade de caminhar sob a água devido  
3 aos tarsos mais flexíveis e podem mergulhar e permanecer submersas por 20  
4 minutos; se alimentam de girinos, insetos e pequenos peixes (Silva, E., 2012;  
5 Motta, 2014; Simó et al., 2011). São animais errantes e possuem cuidado  
6 parental, onde as fêmeas carregam a ooteca, que possui forma achatada, presa  
7 nas fiandeiras, similar ao que é observado em Lycosidae. Além de exibirem outro  
8 comportamento pouco observado em aranhas, os machos de algumas espécies  
9 oferecem presentes nupciais as fêmeas (Jocqué; Dippenaar-Schoeman, 2007;  
10 Silva, E., 2012).

11 Trechaleidae possui os olhos dispostos em padrão tipo 4-4 (**Figura 8**),  
12 porém, diferente de Thomisidae, já que apresentam uma fileira de olhos  
13 pequenos próximo as quelíceras e uma fileira de olhos grandes/medianos acima  
14 (Albo et al., 2017; Carico, 2005; Da Silva; Lise, 2009; Jocqué; Dippenaar-  
15 Schoeman; Zoologin, 2006). Essas aranhas variam de tamanho, podendo  
16 chegar a 19 centímetros com as pernas estendidas, como a espécie *Trechalea*  
17 *bucculenta* (Simon, 1898) considerada a aranha de maior envergadura do  
18 cerrado (Motta, 2014).

19 **Figura 8** – Disposição dos olhos em Trechaleidae padrão 4-4, característica  
20 marcante de definição de grupo, e foto de um exemplar da família.



21 **Fonte:** Da Silva e Lise, 2009 – imagem adaptada pelo autor com foto de João P. Burini –  
22 PrimalShutter.

23

1 Associadas a um ambiente de mata preservada, assim como as espécies  
2 de Ctenidae, Trechaleidae que são semiaquáticas, agregando-se a um ambiente  
3 aquático preservado e propício a suas presas (Foelix, 2011; Polotow; Brescovit,  
4 2014) (**Figura 9**).

5 **Figura 9** – Fotos de exemplares da família Trechaleidae.



6 **Fonte:** Fotos de João Burini (<https://www.primalshutter.com/>) – (2023) e Matheus Pires Rincão  
7 (2020).

### 8 2.3 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO DAS 9 ARANHAS

10 Regiões florestais sempre foram reconhecidas como fontes de riqueza e de  
11 recursos essenciais para a sobrevivência humana. Devido ao uso indiscriminado  
12 dessas áreas, tornou-se necessário estabelecer as "áreas naturais de proteção",  
13 também conhecidas como Unidades de Conservação (UCs). Esses espaços são  
14 protegidos por lei e têm como objetivo preservar atributos naturais relevantes, de  
15 importância ecológica e socioambiental (Carrijo, 2023; WWF/Unidades de  
16 Conservação: conservando a vida, os bens e os serviços ambientais, 2008).  
17

18 O procedimento de criação de UCs no estado do Paraná não discordou  
19 da maioria dos estados. Embora as primeiras iniciativas para a criação de UCs  
20 datem de 1876, o primeiro parque brasileiro foi criado somente em 1937, o  
21 Parque Nacional de Itatiaia. Já no estado do Paraná, o Parque Nacional do  
22 Iguaçu foi muito defendido por Santos Dumont, em 1916, contudo só foi instituído  
23 em 1939, por decreto do presidente da República Getúlio Vargas (Campos;  
24 Costa-Filho, 2005).

1 A história das UCs no Estado está vinculada às áreas remanescentes do  
2 processo de colonização, expansão das fronteiras agrícolas e ocupação do  
3 território paranaense, não possuindo parâmetros similares ligados a proteção  
4 dos diversos ecossistemas. Deste modo, para garantir o amparo à  
5 biodiversidade, não é suficiente somente a proteção das UCs, mas é essencial  
6 aplicar os princípios da biologia populacional nas estratégias de manejo para  
7 otimizar a preservação das espécies e sua variabilidade genética (Campos e  
8 Costa Filho, 2005).

9 Cada UC recebe uma classificação, ligada às suas características e  
10 objetivos a serem abordados. As Unidades de Proteção Integral são preservação  
11 de ecossistemas, proporcionando pesquisas científicas, manejo e educação  
12 ambiental de promover a conservação do meio ambiente Reservas Biológicas  
13 (Rebio) e Parques (nacionais, estaduais e municipais) (MMA – Ministério do Meio  
14 Ambiente, 2000).

15 No presente estudo, enquadram-se nessa classificação a Reserva  
16 Biológica das Perobas (RBP) municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte, que  
17 possui exemplares de mais de 30 metros de altura, assim como diversas  
18 espécies de animais silvestres – alguns ameaçados de extinção – além de  
19 proteger 20 nascentes que compõem a microbacia do rio dos Índios. E o Parque  
20 Estadual Mata dos Godoy, localizado no distrito de Espírito Santo do município  
21 de Londrina, que é uma das últimas reservas naturais de mata nativa existentes  
22 no Norte do Paraná, ele abriga 282 espécies de aves (tucano de bico verde,  
23 araçari de bico branco, jacutinga, macuco, gralha-picaça e urubu-rei, entre  
24 outros) e 65 mamíferos (tamanduá-mirim, macaco-prego, onça-parda, lontra,  
25 quati, anta e o quase extinto gato-mourisco, entre outros) (Carina Bernardino –  
26 Crea/PR, 2019).

27 Todas as Unidades de Conservação possuem importância ambiental, de  
28 modo que o valor está na preservação e manutenção da fauna e flora, incluindo  
29 as espécies em extinção. Além de áreas de valor paisagístico e cultural de  
30 grande relevância histórica e ambiental para o estado (Carina Bernardino –  
31 Crea/PR, 2019).

1            Todo organismo presente nessas áreas demonstra aplicabilidade no  
2            manejo de conservação, firmando a presença das espécies daquelas regiões e  
3            mantendo o equilíbrio populacional. Diante disso, as aranhas com sua alta  
4            distribuição de espécies, alta relevância ecológica e podem ser utilizadas em  
5            monitoramentos ambientais (Antonelli; Sanmartin, 2011; Tinoco et al., 2015). A  
6            riqueza de aranhas em uma determinada região, possui uma forte ligação com  
7            a sensibilidade de cada espécie do grupo, envolvendo fatores abióticos próprios  
8            do ambiente, como temperatura, umidade e intensidade luminosa, onde algumas  
9            aranhas são mais bem adaptadas em ambientes com baixas variações do clima  
10           (Foelix, 2011). O que nos leva a distribuição atribuída também as condições  
11           físicas, envolvendo fatores como o suprimento de presas, quantidade de  
12           competidores, predadores e em especial a vegetação presente de cada habitat  
13           (Souza, 2007).

14           Com o propósito de incluir o uso de aranhas como indicadores biológicos  
15           afim de demonstrar o uso de invertebrados em questões referentes às políticas  
16           de conservação, referenciando que a riqueza e abundância das aranhas possam  
17           refletir a de artrópodes pertencentes a níveis tróficos inferiores, por exemplo.  
18           Além do baixo número de trabalhos voltados a compreensão evolutiva e de  
19           identificação de espécies do grupo das aranhas, cria a necessidade de novos  
20           estudos, principalmente em Unidades de Conservação, que servem para  
21           proteger a diversidade biológica e os recursos genéticos associados  
22           (WWF/Unidades de Conservação: conservando a vida, os bens e os serviços  
23           ambientais, 2008; Ribeiro et al., 2009).

#### 24           2.4 O USO DOS MARCADORES MOLECULARES PARA A CONSERVAÇÃO DAS ARANHAS

25           Os marcadores moleculares são ferramentas e técnicas que detectam  
26           variações herdáveis no fenótipo molecular, englobando diferentes moléculas  
27           como proteínas, enzimas e, principalmente DNA, de modo que dentre esses  
28           marcadores, aqueles que focam nas alterações de DNA são preferíveis devido  
29           sua consistência e relativa independência de interação com o meio para  
30           expressar essas variações (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Onde são utilizadas  
31           para estudos de diversidade genética individual e populacional, reconstrução  
32           filogenética, mapeamento gênico e aplicações conservacionistas (Decanine,

1 2016; Dufresnes et al., 2014; Fernandes; Caparroz, 2013; Schlotterer, 2004;  
2 Telles et al., 2007). Estes estudos são de grande importância para compreensão  
3 dos padrões biogeográficos, conservação e manejo, assim como relacionado a  
4 teorias da evolução e processos biológicos (Dobzhansky, 1976; Hamilton et al.,  
5 2014).

6 Diante desse contexto, o desenvolvimento de abordagens investigativas  
7 demanda algumas metodologias específicas. Os marcadores moleculares  
8 possuem habilidades pontuais em relação a outros marcadores que não se  
9 baseiam em DNA (Agarwal et al., 2008; Duran et al., 2009). Os microsatélites  
10 como *Short Tandem Repeats* (STR), *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Simple*  
11 *Sequence Length Polymorphism* (SSLP), são ferramentas amplamente usadas  
12 nestas áreas de pesquisa, como ecologia molecular e genética de populações.  
13 Por se tratar de marcadores genéticos codominantes, ou seja, que tem a  
14 capacidade de diferenciar os alelos provenientes dos diferentes gametas  
15 parentais. Possuem repetições em *tandem* (1 a 6 bases) com alta taxa de  
16 mutação, os SSRs tornam-se altamente polimórficos e apropriados para  
17 diferentes tipos de estudos (Planas; Bernaus; Ribera, 2014; Zanella et al., 2017).

18 Embora os SSRs apresentem muitas vantagens e aplicabilidades, seu uso  
19 demanda o isolamento e desenvolvimento de *primers* e/ou a disponibilidade de  
20 *primers* de espécies próximas para testes de transferabilidade (Zanella et al.,  
21 2017). Porém as técnicas sendo muito laboriosas, como a técnica de hibridização  
22 seletiva que os fragmentos são ligados a adaptadores com sequências  
23 conhecidas, desnaturados e hibridizados com as sondas de repetições simples.  
24 Em seguida as ligações não específicas são removidas por lavagem e a sonda  
25 hibridizada é restaurada por PCR e clonados para se obter os SSR (Rassmann  
26 et al., 1991).

27 E a técnica de extensão de *primers* que a amostra é submetida a enzimas  
28 de restrição que fragmentam o DNA em tamanhos diferentes produzindo a  
29 biblioteca primária. Os fragmentos selecionados por tamanho são inseridos no  
30 vetor de um fago para a obtenção de DNA circulares de filamentos únicos que  
31 irão servir de moldes para a extensão de uma determinada repetição, gerando  
32 produtos de fita dupla apenas dos vetores com a repetição alvo (Ostrander et al.,

1 1992; Paetkau et al., 1995), e acabavam por clonar apenas uma parte do  
2 genoma.

3 As dificuldades econômicas relacionadas ao seu uso vêm sendo  
4 diminuídas pelo surgimento de novas tecnologias de sequenciamento, como o  
5 Sequenciamento de Nova Geração (NGS), reduzindo não só o custo como a  
6 quantidade de técnicas associadas ao seu desenvolvimento (Santana et al.,  
7 2009).

8 Com advento das tecnologia de melhoramento de nova geração, se  
9 tornou mais rápido e barato obter grande quantidade de sequências genômicas  
10 de uma espécie, o que permite por meio de ferramentas de bioinformática a  
11 investigação de possíveis *loci* de microssatélites candidatos para estudos  
12 populacionais (Delmas et al., 2011; Mardis, 2008). Acrescendo seu uso em uma  
13 extensa gama de organismos, incluindo as aranhas, grupo este que ainda possui  
14 limitações no desenvolvimento e aplicação de microssatélites (Brewer et al.,  
15 2014; Parmakelis et al., 2013).

16 Os microssatélites já são amplamente utilizados em diversos grupos de  
17 organismos, para análises populacionais, como peixes (Apolinário-Silva et al.,  
18 2018; Ferreira et al., 2013; Povh et al., 2010), plantas (Ranathunge; Chimahusky;  
19 Welch, 2022), insetos (Shults et al., 2022); alguns poucos trabalhos vem  
20 surgindo no grupo dos aracnídeos (Macrini et al., 2015; Krehenwinkel, et al.,  
21 2019; Tanikawa, et al., 2018), tendo evidenciado estruturação e isolamento  
22 populacional em diversas espécies, e o potencial mecanismo de dispersão,  
23 como o balonismo, que garante um fluxo gênico, mesmo em populações de  
24 aranhas muito distantes (Tanikawa et al., 2018).

25 Como citado anteriormente, para a utilização de marcadores  
26 microssatélites é necessário fazer a caracterização e descrição destes *loci* no  
27 genoma da espécie que se deseja estudar, o que destaca a importância e  
28 necessidade do isolamento e descrição desses *loci*. As muitas plataformas NGS  
29 vem viabilizando a ampliação desses estudos em muitos grupos de organismos  
30 (Castoe et al., 2012; Davey et al., 2011; Silva, P. et al., 2013).

31 Outra ferramenta que vem crescendo no grupo das aranhas é a  
32 aplicabilidade do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), que

1 dentro de uma década vem sendo indicado para o uso de identificação de  
2 espécies, contudo, sendo utilizado de maneira pontual e associada a taxonomia,  
3 ecologia, biogeografia e genética de populações do grupo ao qual será aplicado  
4 (Hamilton et al., 2014), demonstrando assim maior embasamento aos seus  
5 resultados.

6 Além do uso dessa ferramenta em estudos evolutivos, desde 1979 Brown  
7 e colaboradores, vem investigando a funcionalidade do DNAm e a questão deste  
8 exibir variações entre indivíduos de uma mesma população e de populações  
9 diferentes. Esses estudos vêm crescendo e diversos autores foram aprimorando  
10 o uso deste marcador para reconhecimento de espécies crípticas (Ashfaq e  
11 Hebert, 2016; Hendrich et al., 2015), descoberta de espécies (Mutanen et al.,  
12 2015), revisões taxonômicas (Miller et al., 2016) e avaliações de fauna (Ashfaq  
13 et al., 2018; Telfer et al., 2015), o que o torna um marcador molecular de grande  
14 utilidade nos estudos de estruturação populacional.

15 Dentre os genes mitocondriais, o COI vem ganhando destaque, já que os  
16 dados haplotípicos obtidos em análises com o uso deste marcador podem vir a  
17 inferir relações de processos evolutivos como o fluxo gênico e subdivisão de  
18 populações (Avice, 2004; Barrett; Hebert, 2005; Čandek; Kuntner, 2015; Gerber  
19 et al., 2001; Hebert; Ratnasingham; Dewaard, 2003).

20 A demanda de uso de ferramentas em concomitância tende a  
21 proporcionar uma eficaz delimitação das espécies (Ivanov et al., 2021; Planas;  
22 Fernandez-Montraveta; Ribera, 2013; Starrett et al., 2022). Diante disto, um  
23 crescente número de trabalhos vem usando diferentes algoritmos que  
24 proporcionam essas análises aplicados em alinhamento de COI, como  
25 Generalized Mixture Yule Coalescence (GMYC) que fornece agrupamentos  
26 significativos (clados ou linhagens de DNAm) próximos às espécies  
27 taxonomicamente reconhecidas, ou seja, é uma medida da diferença genética  
28 entre diferentes espécies ou indivíduos (Fujisawa; Barraclough, 2013; Pons et  
29 al., 2006); Poisson Tree Process Method (mPTP) identifica os pontos de  
30 transição entre as taxas de ramificação inter e intraespecíficas em uma árvore  
31 ultramétrica a partir da pontuação máxima de verossimilhança (Kapli et al.,  
32 2017); Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) trabalha da mesma forma que

1 mPTP contudo, ele adiciona valores de suporte Bayesiano (BI) as espécies  
2 delimitados na árvore (Zhang et al., 2013); Automatic Barcode Gap Discovery  
3 (ABGD) propõe o agrupamento das sequências de entrada em várias espécies  
4 hipotéticas pelo uso exclusivo de diferenças pareadas (ou seja, uma matriz de  
5 distância) e Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) um algoritmo  
6 de agrupamento hierárquico que usa apenas distâncias genéticas pareadas,  
7 evitando a carga computacional de reconstrução filogenética, propondo  
8 partições de espécies através de um sistema de pontuação (Puillandre et al.,  
9 2021).

10 A criação de uma base de dados de referência em cada estado, que seja  
11 cuidadosamente validada pela incorporação de técnicas, como as citadas acima,  
12 pode facilitar o estabelecimento de ações de conservação para as espécies de  
13 aranhas inseridas nas Unidades de Conservação dos estados, onde é primordial  
14 a identificação correta das espécies e a avaliação de sua estrutura populacional  
15 sendo analisada com o uso do citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) e o  
16 desenvolvimento de *primers* de SSR.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética de famílias Lycosoidea através de marcadores moleculares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a hipótese da correta identificação morfológica das espécies, bem como verificar a existência de possíveis formas crípticas;
- Testar o sequenciamento de baixa cobertura para o desenvolvimento de primers de microssatélites e testar sua aplicabilidade;
- Investigar a diversidade genética através dos marcadores desenvolvidos.

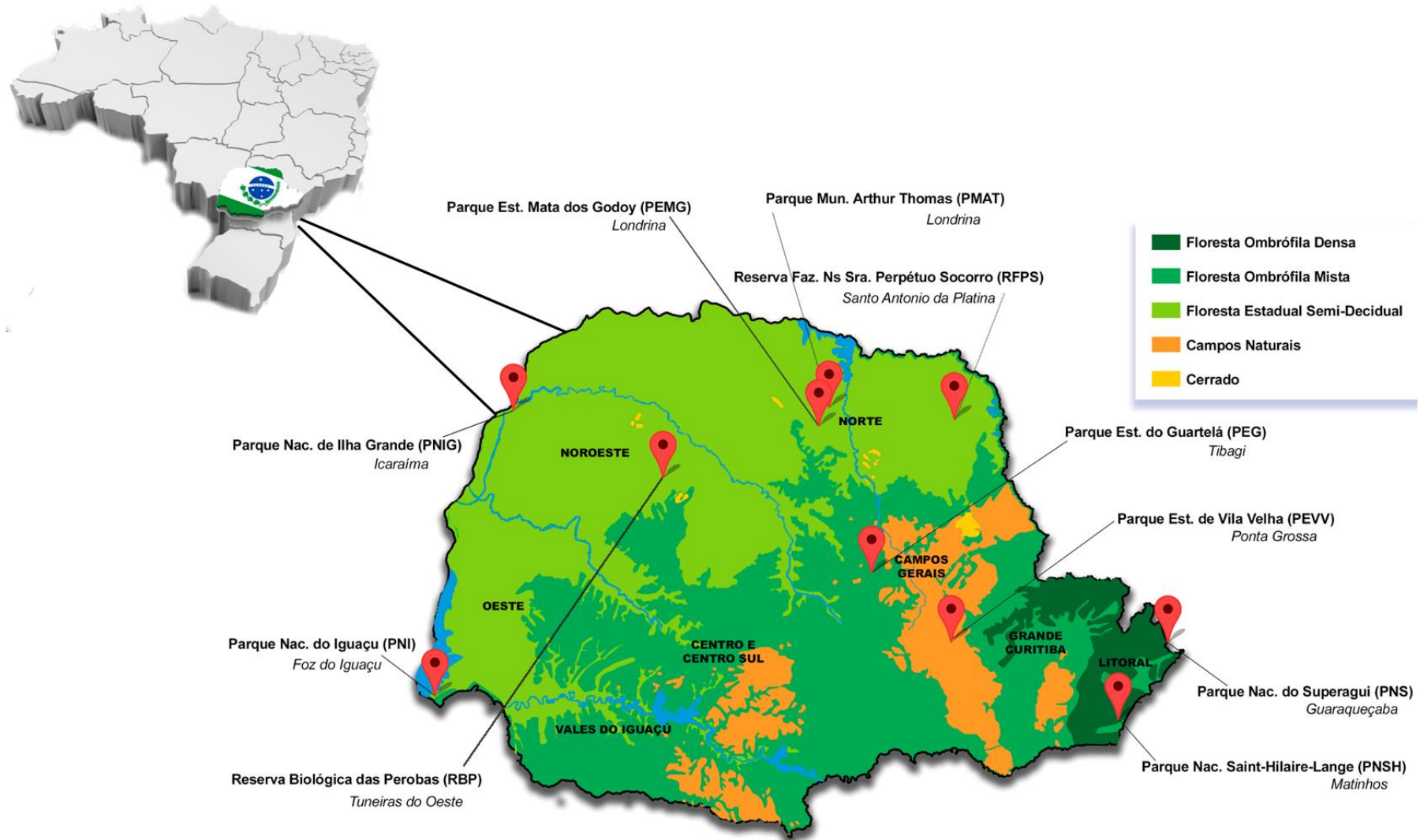
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

No total foram utilizados 148 exemplares de 16 espécies das famílias Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae coletados em dez Unidades de Conservação localizadas no estado do Paraná, sendo elas: Parque Estadual do Guartelá (PEG) – Tibagi (24°33'50.10"S 50°15'35.80"O), Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG) – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O), Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O), Parque Municipal Arthur Thomas (PMAT) – Londrina (23°20'39.00"S 51°08'23.00"O), Parque Nacional do Iguaçu (PNI) – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O), Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) – Icaraíma (23°23'45.10"S 53°49'02.50"O), Parque Nacional de Superagui (PNS) – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O), Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (PNSH) - Matinhos (25°48'42.30"S 48°33'47.50"O), Reserva Biológica das Perobas (RBP) – Tuneiras do Oeste (23°51'30.79"S 52°45'31.28"O) e Reserva Fazenda Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS) - Santo Antônio da Platina (23°18'03.00"S 50°06'02.30"O) (**Figura 10**).

Os espécimes foram coletados por busca ativa, utilizando como material de coleta potes plásticos e uma lanterna de cabeça (as coletas foram noturnas, período de maior atividade desses animais). Após a catalogação dos espécimes foi retirado o material de tecido muscular das pernas para posteriores análises moleculares. Os espécimes foram armazenados em álcool 70% e enviados ao Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curador A. D. Brescovit) São Paulo/SP, Brasil, onde foram identificados e depositados na coleção (**Tabela 1**).

**Figura 10** - Mapa do Brasil com indicação do estado do Paraná apresentando os pontos de coleta. Pontos de localização, demarcam as Unidades de Conservação e seus respectivos municípios. A legenda identifica no mapa os diferentes ecossistemas que compõem os habitats do estado.



**Fonte:** Mariana Costa Terra (2023), adaptado pelo autor.

**Tabela 1** – Famílias e espécies analisadas, locais de coleta e número de espécimes. Amostras: ♂ (macho), ♀ (fêmea) e J (juvenil).

Família	Espécie	Local de Coleta	Amostras		
			♂	♀	J
Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)	PEMG – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O)	3	3	0
		PEVV – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O)	3	2	0
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	3	2	0
		PNI – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O)	3	2	1
	<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891	PEVV – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O)	0	5	0
		PNSH – Matinhos (25°48'42.30"S 48°33'47.50"O)	2	2	1
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	4	1	0
	<i>Guasuctenus longipes</i> (Keyserling, 1891)	PEVV – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O)	0	6	0
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	2	4	0
	<i>Isoctenus coxalis</i> (FO Pickard-Cambridge, 1902)	PEVV – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O)	4	2	0
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	3	3	0
	<i>Isoctenus janeirus</i> (Walckenaer, 1837)	PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	0	6	0
		PNSH – Matinhos (25°48'42.30"S 48°33'47.50"O)	6	0	0
	<i>Isoctenus herteli</i> (Mello-Leitão, 1947)	PEVV – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O)	6	2	0
<i>Isoctenus strandi</i> Mello-Leitão, 1936	PNSH – Matinhos (25°48'42.30"S 48°33'47.50"O)	5	1	0	
<i>Isoctenus ordinario</i> Polotow & Brescovit, 2009	PEMG – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O)	1	3	0	
<i>Parabatinga brevipes</i> (Keyserling, 1891)	PNIG – Icaraíma (23°23'45.10"S 53°49'02.50"O)	1	6	3	
Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	PEMG – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O)	5	0	0
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	4	1	0
	<i>Lycosa nordenskjoldi</i> Tullgren, 1905	PNIG – Icaraíma (23°23'45.10"S 53°49'02.50"O)	2	0	3
		PNS – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)	3	1	0

		PEMG – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O)	5	0	0
	<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	PNI – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O)	3	2	0
		RBP – Tuneiras do Oeste (23°51'30.79"S 52°45'31.28"O)	5	0	0
Thomisidae		PEG – Tibagi (24°33'50.10"S 50°06'02.30"O)	4	0	0
	<i>Tmarus</i> sp. Simão, 1875	RFPS – São Antônio da Platina (23°18'03.00"S 50°06'02.30"O)	4	0	0
Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i> (Mello-Leitão, 1926)	PNI – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O)	4	1	0
	<i>Trechaleoides keyserlingi</i> (F. O. Pickard-Cambridge, 1903)	PMAT - Londrina (23°20'39.00"S 51°08'23.00"O)	2	0	0
	<i>Trechalea</i> sp. Thorell, 1869	PNI – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O)	4	0	0

1 Parque Estadual do Guartelá (PEG), Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG), Parque Estadual  
2 de Vila Velha (PEVV), Parque Municipal Arthur Thomas (PMAT), Parque Nacional do Iguaçu  
3 (PNI), Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG), Parque Nacional de Superagui (PNS), Parque  
4 Nacional Saint-Hilaire-Lange (PNSH), Reserva Biológica das Perobas (RBP) e Reserva Fazenda  
5 Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS).

6

## 7 4.2 MÉTODOS

## 8 4.2.1 Extração do DNA Genômico

9 O DNA genômico foi extraído do tecido muscular da perna das aranhas, a  
10 partir do protocolo com fenol-clorofórmio de Almeida, Fungaro e Sodré (2001).  
11 Em cada microtubo (1,5 mL), foi adicionado 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl  
12 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, SDS 10% e água destilada), inserido o tecido que  
13 fora picotado, depois adicionados 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) em cada  
14 microtubo, homogeneizados e incubados *overnight* a 63°C para digestão do  
15 material, conforme temperatura ótima da enzima.

16 Com relação ao protocolo de lavagens durante a extração foram  
17 procedidas três etapas: na primeira foi adicionado 500 µL de fenol,  
18 homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm em centrífuga  
19 refrigerada a 4°C; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2 mL) no  
20 qual foi adicionado 500 µL de Clorofane (1 fenol : 1 clorofil), seguindo o mesmo  
21 processo de homogeneização e centrifugação; novamente o sobrenadante foi  
22 transferido para um outro tubo novo (2 mL) e adicionado clorofil (24 clorofórmio

1 : 1 álcool isoamílico) em um volume de 500 µL, novamente homogeneizados e  
2 centrifugados. Para precipitação do DNA o sobrenadante foi transferido para um  
3 novo microtubo (1,5mL) e adicionado 10% do volume de NaCl 3M e 2 ½ volumes  
4 de etanol 100% gelado. Invertidos suavemente e mantidos em freezer -20°C por  
5 2 horas.

6 Depois os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm a  
7 4°C, seguidos pelo descarte do sobrenadante e uma segunda lavagem com 100  
8 µL de etanol 70%, sendo descartado logo em seguida. Para evaporação total do  
9 álcool, foi deixado os microtubos em temperatura ambiente por pelo menos 2  
10 horas e o DNA diluído em 50 µL de tampão de estoque (TE). Em gel de agarose,  
11 foi verificada a integridade e quantidade do DNA obtido para posterior diluição.

12  
13

#### 4.2.2 Amplificação do Gene Mitocondrial COI

14 A amplificação parcial da sequência do gene mitocondrial citocromo c  
15 oxidase subunidade I (COI) foi realizada de acordo com Wheeler et al. (2016),  
16 usando o par de *primers* CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3' (CO1-F) e  
17 GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3' (CO1-R) (DICK et al., 2004). Após a  
18 amplificação, o produto da PCR foi verificado em gel de agarose 1% e aqueles  
19 que tiveram sucesso na amplificação foram selecionados para o  
20 sequenciamento. Destas amostras, 10 µL da reação foi purificada com 0,5 µL de  
21 Exosap (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. Os  
22 sequenciamentos foram realizados no sentido *forward* e *reverse* com os  
23 reagentes Big Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo protocolo de  
24 montagem da reação e protocolo de temperatura de acordo com recomendações  
25 do fabricante. Por fim, as regiões amplificadas foram sequenciadas em  
26 sequenciador automático ABI-PRISM 3500-XL (Applied Biosystems).

27 A análise da qualidade foi realizada utilizando o *software online*  
28 Electropherogram Quality Analysis (Togowa; Brigido, 2003). As sequências  
29 obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank  
30 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com uso da ferramenta BLAST (Altschul et al.,  
31 1997) e no banco de dados do BOLD (Ratnasingham; Hebert, 2007)  
32 (<http://www.boldsystems.org/>). Posteriormente, estas sequências foram  
33 alinhadas e editadas manualmente no *software* MEGA 11 (Tamura; Stecher;

1 Kumar, 2021). As sequências foram incorporadas nas análises de distância  
2 genética intra e interespecíficas, baseada no modelo Kimura-2-Parâmetros  
3 (Kimura, 1980).

4 Devido a lacuna existente nos bancos de dados, com relação as  
5 espécies da região Neotropical, a identificação das sequências se manteve  
6 através da análise de morfologia realizada no Instituto Butantan (IBSP, curador  
7 A. D. Brescovit).

8

#### 9 4.2.3 Análises de Agrupamento

10 As análises de agrupamento identificaram a diversidade de espécies  
11 dentro do conjunto amostral utilizado. Essa identificação foi realizada  
12 observando as formações das unidades taxonômicas operacionais baseadas  
13 nos dados moleculares (MOTU's) junto aos diferentes algoritmos apresentados  
14 a seguir.

15 Quatro análises de delimitação de espécies independentes foram  
16 aplicadas aos alinhamentos de COI-3P: Generalized Mixed Yule Coalescence  
17 (GMYC) (Pons et al., 2006; Fujisawa; Barraclough, 2013), Poisson Tree Process  
18 Method (mPTP) (Kapli et al., 2017), Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP)  
19 (Zhang et al., 2013) com visualização Phylomap, Automatic Barcode Gap  
20 Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012) e Assemble Species by Automatic  
21 Partitioning (ASAP) (Puillandre et al., 2021). Os arquivos necessários para os  
22 algoritmos citados, foram construídos nos *softwares* Kakusan 3 (Tanabe, 2007),  
23 MEGA 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021), Beast / Beauti v1.10.4 (Suchard et  
24 al., 2018) e as respectivas árvores Bayesianas (BI) (Mr Bayes) e Máxima  
25 Verossimilhança (ML) (RaxML) geradas na plataforma CIPRES (Miller; Pfeiffer;  
26 Schwartz, 2010) (<https://www.phylo.org/index.php/>).

27 Os programas de análises como TreeAnnotator (Drummond;  
28 Rambaut, 2007), Tracer (Rambaut et al., 2018) e Fig Tree (Rambaut, 2010)  
29 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), foram usados vinculados ao pacote de  
30 *software* do Beast (Suchard et al., 2018). E as árvores foram analisadas e  
31 editadas no Fig Tree e no Adobe Photoshop CS6.



1 A verificação da qualidade dos *loci* de microssatélites foi realizada em 34  
2 espécimes de *Ctenus ornatus*, assim como a transferabilidade foi testada com  
3 amplificação cruzada em cinco espécimes de oito espécies da família Ctenidae  
4 e uma espécie da família Lycosidae. As espécies testadas foram: *Ctenus medius*  
5 Keyserling, 1891; *Guasuctenus longipes* (Keyserling, 1891); *Isoctenus coxalis*  
6 (FO Pickard-Cambridge, 1902); *I. janeirus* (Walckenaer, 1837); *I. herteli* (Mello-  
7 Leitão, 1947); *I. strandi* Mello-Leitão, 1936; *I. ordinario* Polotow & Brescovit, 2009;  
8 *Parabatinga brevipes* (Keyserling, 1891) e *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836.

9 As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 10  $\mu$ L,  
10 contendo 4,5 $\mu$ L GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,2 $\mu$ L glicerol, 0,25 $\mu$ L  
11 *primer* mix, 0,25 $\mu$ L de iniciador M13 com fluorescência (FAM, HEX, NED e PET;  
12 Applied Biosystems), e 2 $\mu$ L de amostra de DNA. A amplificação foi realizada com  
13 a desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 10 ciclos de 94°C por 30 s,  
14 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido por 25 ciclos de 89°C por 30 s, 56°C  
15 por 1 min e 72°C por 1 min, e com extensão final de 72°C por 30 min. Os produtos  
16 de PCR foram genotipados em sequenciador automático ABI3500 xL (Applied  
17 Biosystems) usando o marcador de peso molecular GeneScan 600 Liz (Applied  
18 Biosystems).

19 O tamanho dos alelos foi determinado manualmente usando o programa  
20 GeneMarker v.2.2.0 (SoftGenetics). No Micro Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout  
21 et al., 2004) alelos nulos, desistências de alelos e erros de anotação foram  
22 verificados. O número de alelos por *locus* ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ )  
23 e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foram obtidos em GenAlEx v.6.5 (Peakall;  
24 Smouse, 2006). O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi calculado no Arlequin  
25 programa v.3.5.2.2 (Excoffier; Lischer, 2010). A estimativa de equilíbrio de  
26 Hardy-Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação, com as correções de  
27 Bonferroni, foram realizadas no GENEPOP v.1.2 (Raymond; Rousset, 1995;  
28 Rousset, 2008). O *software* Structure v.2.3 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado  
29 para obter a estruturação populacional dos grupos amostrados, sendo estimado  
30 o número de *clusters* ( $K$ ) mais prováveis via análise Bayesiana. Os aplicativos  
31 *online* Structure Harvester 0.6.93 (Earl, 2012) e Clumpak  
32 (<http://clumpak.tau.ac.il/>) (Kopelman et al., 2015) foram utilizados para inferir

1 estatisticamente qual  $K$  mais provável e para agrupar os resultados de Structure  
2 via método  $\Delta K$  de Evanno (Evanno et al., 2005).

### 3 REFERÊNCIAS

- 4 AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker  
5 techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, v. 27, n.  
6 4, p. 617-631, 2008.
- 7 ALBO, M. J.; BIDEGARAY-BATISTA, L.; BECHSGAARD, J.; DA SILVA, E. L. C.;  
8 BILDE, T.; PÉREZ-MILES, F. Molecular phylogenetic analyses show that  
9 Trechaleidae and Lycosidae are sister groups. **Arachnology**, v.17, n.4, p.169-  
10 176, 2017.
- 11 ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme  
12 analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes:  
13 Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. **Journal of Zoology**, v.253, n.1,  
14 p.113-120, 2001.
- 15 ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.;  
16 MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation  
17 of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v.25, n.17,  
18 p.3389-3402, 1997.
- 19 ANDREWS, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput  
20 Sequence Data [Online]. Available online  
21 at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- 22 ANTONELLI, A.; SANMARTIN, I. Why are there so many plant species in the  
23 Neotropics? **Taxon**, v.60, p.403-414, 2011.
- 24 AKPINAR, A.; MAMMADOVA, R. Genetic Population Structures Based on the  
25 Coi Gene of *Bassaniodes pseudorectilineus* (Araneae: Thomisidae).  
26 **Entomological News**, v.129, n.3, p.217-229, 2020.
- 27 APOLINÁRIO-SILVA, C.; FERREIRA, D. G.; CAVENAGH, A. F.; APRÍGIO, N.  
28 G.; GALINDO, B. A.; CARLSSON, J.; SOFIA, S. H. Development and  
29 characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci in *Bryconamericus* aff.  
30 *iheringii* (Teleostei: Characidae) and cross-amplification in related Characidae  
31 species. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 1, 2018.  
32
- 33 ASHFAQ, M.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes for bio-surveillance: Regulated  
34 and economically important arthropod plant pests. **Genome**, v.59, p.933–945,  
35 2016. pmid:27753511
- 36 ASHFAQ, M.; SABIR, J. S. M.; EL-ANSARY, H. O.; PEREZ, K.; LEVESQUE-  
37 BEAUDIN, V.; KHAN, A. M.; RASOOL, A.; GALLANT, C.; ADDESI, J.; HEBERT,  
38 P. D. N. Insect diversity in the Saharo-Arabian region: Revealing a little-studied  
39 fauna by DNA barcoding. **PLOS ONE**, v.13, 2018. e0199965. pmid:29985924

- 1 AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution** (2nd ed.).  
2 Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2004.  
3
- 4 BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA  
5 barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v.491, n.83, p.481–491, 2005.
- 6 BEIER, S.; THIEL, T.; MÜNCH, T.; SCHOLZ, U.; MASCHER, M. MISA-web: a  
7 web server for microsatellite prediction. **Bioinformatics**, v.33, p.2583–2585,  
8 2017. [dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198)
- 9 BENJAMIN, S. P.; DIMITROV, D.; GILLESPIE, R. G.; HORMIGA, G. Family ties:  
10 molecular phylogeny of crab spiders (Araneae: Thomisidae). **Cladistics**, v.24,  
11 n.5, p.708-722, 2008.
- 12 BERNARDINO, C. Meio Ambiente: Paraná tem quase 70 unidades de  
13 conservação. **G1**. Paraná, 06 dez 2019. Disponível em:  
14 [https://g1.globo.com/pr/parana/especial-publicitario/crea-pr/engenharias-  
15 geociencias-e-voce/noticia/2019/12/06/meio-ambiente-parana-tem-quase-70-  
16 unidades-de-conservacao.ghtml](https://g1.globo.com/pr/parana/especial-publicitario/crea-pr/engenharias-geociencias-e-voce/noticia/2019/12/06/meio-ambiente-parana-tem-quase-70-unidades-de-conservacao.ghtml)
- 17 BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.F. **Host-plant selection by phytophagous**  
18 **insects**. New York: Chapman & Hall. 312 p. 1994.
- 19 BREWER, M. S.; COTORAS, D. D.; CROUCHER, P. J.; GILLESPIE, R. G. New  
20 sequencing technologies, the development of genomics tools, and their  
21 applications in evolutionary arachnology. **Journal of Arachnology** 42:1-15,  
22 2014.
- 23 BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal  
24 mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**  
25 **United States of America**, v.76, n.4, p.1967–71, 1979.
- 26 BURINI, J. P. PrimalShutter: Nature Photography. 2019. Disponível em:  
27 <https://www.primalshutter.com/>
- 28 CAMPOS, J. B.; COSTA-FILHO, L. V. Pode Conservar? – Sistema ou Conjunto  
29 de Unidades de Conservação. *In*: CAMPOS, J. B.; TOSSULINO, M. G. P.;  
30 MÜLLER, C. R. C. **Unidades de Conservação: Ações para valorização da**  
31 **biodiversidade**. Curitiba: IAP, verão de 2005. p. 17-22.
- 32 ČANDEK, K.; KUNTNER, M. DNA barcoding gap: reliable species identification  
33 over morphological and geographical scales. **Molecular Ecology Resources**,  
34 v.15, n.2, p.268-277, 2015.
- 35 CARICO, J. E. Descriptions of two new spider genera of Trechaleidae (Araneae,  
36 Lycosoidea) from South America. **The Journal of Arachnology**, v.33, n.3, p.797-  
37 812, 2005.
- 38 CARRIJO, B. R. Unidades de conservação no Sudoeste do Paraná. **Revista Faz**  
39 **Ciência**, [S. l.], v. 25, n. 42, 2023. DOI: 10.48075/rfc.v25i42.31529. Disponível  
40 em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/fazciencia/article/view/31529>

- 1 CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; KONING, A. P. J.; JONES, K. L.; TOMBACK, D.  
2 F.; OYLER-MCCANCE, S. J.; FIKE, J. A.; LANCE, S. L.; STREICHER, J. W.;  
3 SMITH, E. N.; POLLOCK, D. D. Rapid microsatellite identification from Illumina  
4 paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. **PloS one**, v. 7, n. 2,  
5 p. e30953, 2012.
- 6 CHEMISQUY, M. A.; GIL, S. G. R.; SCIOSCIA, C. L.; MOLA, L. M. Cytogenetic  
7 studies of three Lycosidae species from Argentina (Arachnida,  
8 Araneae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.857-867, 2008.
- 9 CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. Systematics and evolution of spiders  
10 (Araneae). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.22, p.565-592,  
11 nov.1991. ISSN 0066-4162
- 12 DA SILVA, E. L. C.; LISE, A. A. New record of nuptial gift observed in *Trechalea*  
13 *amazonica* (Araneae, Lycosoidea, Trechaleidae). **Revista Peruana de Biología**,  
14 v.16, n.1, p.119-120, 2009.
- 15 DA SILVEIRA, L. C. T.; BONATTO, S. L. Isolation and characterization of 12  
16 dinucleotide microsatellite loci in *Paratrechalea galianoae* (Araneae,  
17 Trechaleidae), a nuptial gift-spider. **Molecular ecology resources**, v.9, n.2,  
18 p.539-541, 2009.
- 19 DAVEY, J. W.; HOHENLOHE, P. A.; ETTER, P. D.; BOONE, J. Q.; CATCHEN,  
20 J. M.; BLAXTER, M. L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping  
21 using next-generation sequencing. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499,  
22 2011.
- 23 DE ALMEIDA, S.; MESSAS, Y.; CICCHI, P. Predation on newly metamorphosed  
24 toad *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) by the spider, *Lycosa erythrognatha*  
25 (Araneae: Lycosidae). **Herpetology Notes**, v.3, p.173–174, 2010.
- 26 DECANINE, D. O papel de marcadores moleculares na genética forense.  
27 **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 5, n. 2, p. 18-27, 2016.
- 28 DELMAS, C. E. L.; LHUILLIER, E.; PORNON, A.; ESCARAVAGE, N. Isolation  
29 and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum*  
30 (Ericaceae) using pyrosequencing technology. **American journal of botany**, v.  
31 98, n. 5, p. e120-e122, 2011.
- 32 DICK, C. W.; ROUBIK, D. W.; GRUBER, K. F.; BERMINGHAM, E. Long-distance  
33 gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae:  
34 Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography.  
35 **Molecular Ecology**, v.13, n.12, p.3775-3785, 2004.
- 36 DOBZHANSKY, T. **Organismic and Molecular Aspects of Species**  
37 **Formation**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1976.
- 38 DRUMMOND, A. J. A.; RAMBAUT. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by  
39 sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.214, 2007.

- 1 DUFRESNES, C.; BRELSFORD, A.; BÉZIERS, P.; PERRIN, N. Stronger  
2 transferability but lower variability in transcriptomic than in anonymous  
3 microsatellites: evidence from Hylid frogs. **Molecular ecology resources**, v. 14,  
4 n. 4, p. 716-725, 2014.
- 5 DURAN, C.; APPLEBY, N.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. Molecular genetic  
6 markers: discovery, applications, data storage and visualization. **Current**  
7 **Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 16-27, 2009
- 8 EARL, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing  
9 STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation**  
10 **Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.
- 11 EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of  
12 individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular**  
13 **Ecology**, v.14, n.8, p. 2611-2620, 2005.
- 14 EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of  
15 programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.  
16 **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567, 2010.
- 17 FERNANDES, G. A.; CAPARROZ, R. DNA sequence analysis to guide the  
18 release of blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*, Psittaciformes, Aves) from the  
19 illegal trade back into the wild. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 3, p. 2757-  
20 2762, 2013.
- 21 FERREIRA, D. G.; GALINDO, B. A.; ALVES, A. N.; ALMEIDA, F. S.; RUAS, C.  
22 F.; SOFIA, S. H. Development and characterization of 14 microsatellite loci in the  
23 Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). **Journal of fish**  
24 **biology**, v.83, n.5, p. 1430-1438. 2013.
- 25 FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores**  
26 **moleculares en el análisis genético**. Embrapa, 1998.
- 27 FOELIX, R. F. '**Biology of Spiders**.' 3rd ed. Oxford University Press: New York,  
28 2011.
- 29 FRANCISCO, R. C. **Estudo da comunidade de aranhas (Araneae: Arachnida)**  
30 **de solo como ferramenta de diagnóstico ambiental**. 2011. 75f. Dissertação  
31 (Mestrado em Zoologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,  
32 2011.
- 33 FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus  
34 data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method  
35 and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v.62, n.5, p.707-  
36 724, 2013.
- 37 GERBER, A. S.; LOGGINS, R.; KUMAR, S.; DOWLING, T. E. Does nonneutral  
38 evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial  
39 genomes? **Annual Review of Genetics**, v.35, p.539-66, 2001.

- 1 GONZAGA M. O.; SANTOS A. J.; JAPYASSÚ H. F. **Ecologia e comportamento**  
2 **de aranhas**. Editora Interciência, 2007.
- 3 GRECO, C.F.; KEVAN, P.G. Contrasting patch choosing by anthophilous  
4 ambush predators: vegetation and floral cues for decisions by a crab spider  
5 (*Misumena vatia*) and males and females of an ambush bug (*Phymata*  
6 *americana*). **Canadian Journal of Zoology**, v.72, p.1583-1588, 1994.
- 7 HAMILTON, C. A.; HENDRIXSON, B. E.; BREWER, M. S.; BOND, J. E. An  
8 evaluation of sampling effects on multiple DNA barcoding methods leads to an  
9 integrative approach for delimiting species: a case study of the North American  
10 tarantula genus *Aphonopelma* (Araneae, Mygalomorphae,  
11 Theraphosidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.71, p.79-93, 2014.
- 12 HAUKE, T. J.; HERZIG, V. Dangerous arachnids—Fake news or reality?  
13 **Toxicon**, v. 138, p. 173-183, 2017.
- 14 HAZZI N. A.; POLOTOW D.; BRESCOVIT A. D.; GONZÁLEZ-OBANDO R.;  
15 SIMÓ M. Systematics and biogeography of *Spinoctenus*, a new genus of  
16 wandering spider from Colombia (Ctenidae). **Invertebrate Systematics** v.32,  
17 p.111-158, 2018.
- 18 HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological  
19 identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The**  
20 **Royal Society**, v.270, n.1512, p.313–21, 2003.
- 21 HENDRICH, L.; MORINIÈRE, J.; HASZPRUNAR, G.; HEBERT, P. D. N.;  
22 HAUSMANN, A.; KÖHLER, F.; BALKE, M. A comprehensive DNA barcode  
23 database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more  
24 than 3500 identified species to BOLD. **Molecular Ecology Resources**, v.15,  
25 p.795–818, 2015. pmid:25469559
- 26 HOEFLER, C. D., PERSONS, M. H., RYPSTRA, A. L. Evolutionarily costly  
27 courtship displays in a wolf spider: a test of viability indicator theory. **Behavioral**  
28 **Ecology**, v.19, p.974–979, 2008.
- 29 INBIOVERITAS (S. Scharf.). **Sistemática e Evolução**. Ludger Scheuermann;  
30 Hubert Höfer; Florian Raub. 2012. Disponível em:  
31 [http://www.inbioveritas.net/en/spiders/team\\_engl](http://www.inbioveritas.net/en/spiders/team_engl)
- 32 IVANOV, V.; MARUSIK, Y.; PÉTILLON, J.; MUTANEN, M. Relevance of  
33 ddRADseq method for species and population delimitation of closely related and  
34 widely distributed wolf spiders (Araneae, Lycosidae). **Scientific reports**, v.11,  
35 n.1, p.1-14, 2021.
- 36 JOCQUÉ, R.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A.S. **Spiders families of the world**. 2<sup>a</sup>  
37 edição. Royal Museum for Central África. 2007.
- 38 JOCQUÉ, R.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A. S.; ZOOLOGIN, S. **Spider families**  
39 **of the world**, 2006.

- 1 KAPLI, P.; LUTTEROPP, S.; ZHANG, J.; KOBERT, K.; PAVLIDIS, P.;  
2 STAMATAKIS, A.; FLOURI, T. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus  
3 species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo.  
4 **Bioinformatics**, v.33, n.11, p.1630-1638, 2017.
- 5 KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base  
6 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of**  
7 **Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- 8 KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.;  
9 MAYROSE, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and  
10 packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology**  
11 **Resources**, v.15, n.5, p.1179-1191, 2015.
- 12 KREHENWINKEL, H.; MEESE, S.; MAYER, C.; RUCH, J.; SCHNEIDER, J.;  
13 BILDE, T.; KUNZEL, S.; HENDERSON, J. B.; RUSSACK, J.; SIMISON, W. B.;  
14 GILLESPIE, R.; UHL, G. Cost effective microsatellite isolation and genotyping by  
15 high throughput sequencing. **The Journal of Arachnology**, v. 47, n. 2, p. 190-  
16 201, 2019.
- 17 KRUEGER, F. Trim Galore!: A wrapper around Cutadapt and FastQC to  
18 consistently apply adapter and quality trimming to FastQ files, with extra  
19 functionality for RRBS data. **Babraham Institute**, 2015.
- 20 LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A  
21 técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de  
22 plantas. **Lundiana**, v.3, p.87-92. 2002.
- 23 MACRINI, C. M. T.; PERES, E. A.; SOLFERINI, V. N. Cryptic diversity of  
24 *Agloactenus lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic rainforest:  
25 evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. **Journal of**  
26 **Applied Biology Biotechnology**, v. 3, p. 009-014, 2015.
- 27 MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review**  
28 **Genomics Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.
- 29 MESTRE, L. A. M.; GASNIER, T. R. Populations of *Ctenus* wandering spiders in  
30 Amazonian Forest fragments. **Acta Amazonica**, v.38, p.159-164, 2008.
- 31 MILLER, S. E.; HAUSMANN, A.; HALLWACHS, W.; JANZEN, D. H. Advancing  
32 taxonomy and bioinventories with DNA barcodes. **Philosophical Transactions**  
33 **of the Royal Society B**, v.371, 2016. 20150339.
- 34 MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science**  
35 **Gateway for inference of large phylogenetic trees**. *In*: Proceedings of the  
36 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, p. 1-8,  
37 2010.
- 38 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de**  
39 **2000**. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal,  
40 institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras

- 1 providências. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/legislacao/areas->  
2 protegidas
- 3 MOTTA, P.C. **Aracnídeos do cerrado**. Rio de Janeiro/Brasil. Technical books  
4 editores, 2014.
- 5 MUTANEN, M.; KEKKONEN, M.; PROSSER, S. W. J.; HEBERT, P. D. N.; KAILA,  
6 L. One species in eight: DNA barcodes from type specimens resolve a taxonomic  
7 quagmire. **Molecular Ecology Resources**, v.15, p.967–984, 2015.  
8 pmid:25524367
- 9 NYFFELER, M., BENZ, G. Spiders in natural pest control: a review. **Journal of**  
10 **Applied Entomology**, v.103, p.321-339, 1987.
- 11 NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAIŠL, J.; MACAS, J.  
12 RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization  
13 of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads.  
14 **Bioinformatics**, v.29, n.6, p.792-793, 2013.
- 15 ORME, C.D.L.; DAVIES, R.G.; MALCOLM, B.; EIGENBROD, F.; PICKUP, N.;  
16 OLSON, V. A.; WEBSTER, A. J.; DING, T.S.; RASMUSSEN, P. C.; RIDGELY,  
17 R. S.; STATTERSFIELD, A. J.; BENNETT, P. M.; BLACKBURN, T. M.; GASTON,  
18 K. J.; OWENS, I. P. F. Global hotspots of species richness are not congruent with  
19 endemism or threat. **Nature**, v.436, p.1016-1019, 2005. PMid:16107848.  
20 doi:10.1038/nature03850
- 21 OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-  
22 insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences.  
23 **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 8, p. 3419-3423,  
24 1992.
- 25 PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite  
26 analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular ecology**, v.  
27 4, n. 3, p. 347-354, 1995.
- 28 PARMAKELIS, A.; BALANIKA, K.; TERZOPOULOU, S.; RIGAL, F.; BEASLEY,  
29 R. R.; JONES, K. L.; LANCE, S. L.; WHITTAKER, R. J.; TRIANTIS, K. A.;  
30 BORGES, P. V. 2013. Development of 28 polymorphic microsatellite markers for  
31 the endemic Azorean spider *Sancus acoreensis* (Araneae, Tetragnathidae).  
32 **Conservation Genetics Resources**, v.5, p.1133-1134, 2013.
- 33 PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel.  
34 Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**  
35 **Notes**, v.6, n.1, p.288–295, 2006.
- 36 PEIGNEUR S.; DE LIMA M. E.; TYTGAT J. *Phoneutria nigriventer* venom: A  
37 pharmacological treasure. **Toxicon**, v.151, p.96-110, 2018.
- 38 PERES, E. A. **Estudo Genético de Populações de *Araneus venatrix***  
39 **(Arachnida: Araneae) do Estado de São Paulo**. 2010. 79f. Dissertação

- 1 (Mestrado em Genética Animal e Evolução) – Universidade Estadual de  
2 Campinas, Campinas, 2010.
- 3 PIACENTINI, L. N.; RAMÍREZ, M. J. Hunting the wolf: A molecular phylogeny of  
4 the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). **Molecular phylogenetics and**  
5 **Evolution**, v.136, p.227-240, 2019.
- 6 PLANAS, E.; BERNAUS, L.; RIBERA, C. Development of novel microsatellite  
7 markers for the spider genus *Loxosceles* (Sicariidae) using next-generation  
8 sequencing. **Journal of arachnology**, p.315-317, 2014.
- 9 PLANAS, E.; FERNANDEZ-MONTRAVETA, C.; RIBERA, C. Molecular  
10 systematics of the wolf spider genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae) in the Western  
11 Mediterranean Basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.67, n.2,  
12 p.414-428, 2013.
- 13 POLOTOW D.; BRESOVIT A. D. Phylogenetic analysis of the tropical wolf  
14 spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). **Zoological Journal**  
15 **of the Linnean Society**, v.170, p.333-361, 2014.
- 16 POLOTOW, D.; CARMICHAEL, A.; GRISWOLD, C.E. Total evidence analysis of  
17 the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae,  
18 Entelegynae). **Invertebrate Systematics**, v.29, n.2, p.124-163, 2015.
- 19 PONS, J.; BARRACLOUGH, T. G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.;  
20 DURAN, D. P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W. D.; VOGLER, A. P.  
21 Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed  
22 insects. **Systematic biology**, v.55, n.4, p.595-609, 2006.
- 23 POUCHKINA-STANTCHEVA, N. N.; MCQUEEN-MASON, S. J. Molecular  
24 studies of a novel dragline silk from a nursery web spider, *Euprosthenops* sp.  
25 (Pisauridae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B:**  
26 **Biochemistry and Molecular Biology**, v.138, n.4, p.371-376, 2004.
- 27 POVH, J.; PEREIRA, R.; NADEZ, R.; JR STREIT, D.; MARQUES, H.,  
28 SIEWERDT, F., LOPERA-BARRERO, N.; MANGOLIN, C.; VARGAS, L.  
29 Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus*  
30 to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction.  
31 Brazilian archives of biology and technology, na **International Journal**. March-  
32 April, v.53, p.389-396, 2010.
- 33 PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000). Inference of  
34 population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-  
35 959, 2000.
- 36 PULLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by  
37 automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v.21, n.2, p.609-620,  
38 2021.
- 39 PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. J. M. E. ABGD,  
40 Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular**  
41 **ecology**, v.21, n.8, p.1864-1877, 2012.

- 1 RAMBAUT, A. **FigTree v1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of  
2 Edinburgh, Edinburgh, 2010. Disponível em:  
3 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- 4 RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A.  
5 Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic**  
6 **Biology**, syy032, 2018. doi:10.1093/sysbio/syy032
- 7 RANATHUNGE, C.; CHIMAHUSKY, M. E.; WELCH, M. E. A comparative study  
8 of population genetic structure reveals patterns consistent with selection at  
9 functional microsatellites in common sunflower. **Molecular Genetics and**  
10 **Genomics**, v.297, n.5, p.1329-1342, 2022.
- 11 RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence  
12 loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting.  
13 **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 113-118, 1991.
- 14 RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING - Bold: The Barcode of  
15 Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, 2007. doi:  
16 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- 17 RAYMOND, M.; ROUSSET, F. **GENEPOP** on the Web (Version 3.4), 1995.  
18 Online at <http://wbiom.ed.curtin.edu.au/genepop/> Updated from Raymond &  
19 Rousset.
- 20 REGO, F. N.; VENTICINQUE, E. M.; BRESCOVIT, A. D. Densidades de aranhas  
21 errantes (Ctenidae e Sparassidae, Araneae) em uma floresta  
22 fragmentada. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1A, p. 45-52, 2005.
- 23 RIBEIRO M. C.; METZGER J. P.; MARTENSEN A. C.; PONZONI F. J.; HIROTA  
24 M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining  
25 forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation** v.142,  
26 p.1141-1153, 2009.
- 27 RIECHERT, S.E., LOCKLEY, T.C. Spiders as biological control agents. **Annual**  
28 **Review Entomology**, v.29, p.299-320, 1984.
- 29 ROCHA-FILHO, L. C; RINALDI, I. M. P. Crab spiders (Araneae: Thomisidae) in  
30 flowering plants in a Brazilian "Cerrado" ecosystem. **Brazilian journal of**  
31 **biology**, v.71, p. 359-364, 2011.
- 32 ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop  
33 software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.103-  
34 106, 2008.
- 35 ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer 3 on the www for general users and for  
36 biologist programmers. *In: **Bioinformatics Methods and Protocols**: Methods in*  
37 *Molecular Biology* (Krawetz, S. & Misener, S., ed.), Totowa, NJ: Humana Press,  
38 p.365-386, 2000.
- 39 RUEDA, A.; REALPE, E.; URIBE, A. Avaliação da toxicidade e caracterização  
40 inicial do veneno de *Latrodectus* sp. **Toxicon**, v. 125, p.53-58, 2017.

- 1 SALGADO-ROA, F. C.; GAMEZ, A.; SANCHEZ-HERRERA, M.; PARDO-DIAZ,  
2 C.; SALAZAR, C. Divergence promoted by the northern Andes in the giant fishing  
3 spider *Ancylometes bogotensis* (Araneae: Ctenidae). **Biological Journal of the**  
4 **Linnean Society**, v.132, n.3, p.495-508, 2021.
- 5 SANTANA, Q. C.; COETZEE, M. P.; STEENKAMP, E. T.; MLONYENI, O. X.;  
6 HAMMOND, G. N.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Microsatellite  
7 discovery by deep sequencing of enriched genomic  
8 libraries. **Biotechniques**, v.46, n.3, p.217-223, 2009.
- 9 SCHICK, R.X. The crab spiders of California (Araneida: Thomisidae). **Bulletin of**  
10 **the American Museum of Natural History**, v.129, p.1-180, 1965.
- 11 SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter of  
12 fashion? **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 1, p. 63, 2004.
- 13 SCHMIDT, J. O. Toxinas e venenos de artrópodes. In: **Entomologia Médica e**  
14 **Veterinária**. Academic Press, 2019. p. 23-31.
- 15 SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR  
16 fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p.233–234, 2000.
- 17 SCHWENDINGER, P. J. A revision of the trapdoor spider genus *Liphistius*  
18 (Mesothelae: Liphistiidae) in peninsular Malaysia; part 1. **Revue Suisse de**  
19 **Zoologie** v.124 n.2, p.391-445, 2017.
- 20 SHULTS, P.; MORAN, M.; BLUMENFELD, A. J.; VARGO, E. L.; COHNSTAEDT,  
21 L. W.; EYER, P. A. Development of microsatellite markers for population genetics  
22 of biting midges and a potential tool for species identification of *Culicoides*  
23 *sonorensis* Wirth & Jones. **Parasites & Vectors**, v.15, n.1, p.69, 2022.
- 24 SILVA, E. L. C. **Sistemática e filogenia de Trechaleidae (Araneae,**  
25 **Lycosoidea)**. 2012. 68p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Pontifícia  
26 Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Faculdade de Biociências, Porto  
27 Alegre, 2012.
- 28 SILVA, P. I. T.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; PESSOA-FILHO, M.;  
29 FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for  
30 *Brachiarina ruzizensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-  
31 end reads. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.
- 32 SILVA-DÁVILA D. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae  
33 (Araneae: Ctenoidea). **Bulletin of the American Museum of Natural History**  
34 v.274, p.1-86, 2003.
- 35 SIMÓ, M.; LABORDA, A.; JORGE, C.; CASTRO, M. Araneomorphae, el grupo  
36 más diverso de las arañas. In: VIERA, Carmen. **Arácnidos de Uruguay:**  
37 **diversidade, comportamento y ecología**. Montevidéo/Uruguai. Ediciones de La  
38 Banda Oriental SRL, 2011.

- 1 SIMPSON, J.T.; WONG, K.; JACKMAN, S.D.; SCHEIN, J.E.; JONES, S.J.;  
2 BIROL, I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome*  
3 *Res.* 2009 Jun;19(6):1117-23. doi: 10.1101/gr.089532.108.
- 4 SIRVID, P. J.; MOORE, N. E.; CHAMBERS, G. K.; PRENDERGAST, K. A  
5 preliminary molecular analysis of phylogenetic and biogeographic relationships  
6 of New Zealand Thomisidae (Araneae) using a multi-locus  
7 approach. ***Invertebrate Systematics***, v.27, n.6, p.655-672, 2013.
- 8 SOLÉ-CAVA, A. J.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza, In:  
9 Matioli, S. R.; FERNANDES, F.M.C. (Eds.). ***Biologia Molecular e Evolução***.  
10 Ribeirão Preto: Holos, p. 217-238. 2012.
- 11 SOUZA, A. L. T. **Influência da estrutura do habitat na abundância e**  
12 **diversidade de aranhas**. In: Gonzaga, M. O.; Santos, A. J.; Japyassú, H. F.  
13 (eds) *Ecologia e comportamento de aranhas*. Editora Interciência, Rio de  
14 Janeiro, 2007.
- 15 STARRETT, J.; MCGINLEY, R. H.; HEBETS, E. A.; BOND, J. E. Phylogeny and  
16 secondary sexual trait evolution in *Schizocosa* wolf spiders (Araneae, Lycosidae)  
17 shows evidence for multiple gains and losses of ornamentation and species  
18 delimitation uncertainty. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v.169, 2022.
- 19 STRATTON, G. E.; UETZ, G. W. Communication via substratum-coupled  
20 stridulation and reproductive isolation in wolf spiders (Araneae: Lycosidae).  
21 ***Animal Behaviour*** v.31, p.164–172, 1983.
- 22 SUCHARD, M. A.; LEMEY, P.; BAELE, G.; AYRES, D. L.; DRUMMOND, A. J.;  
23 RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using  
24 BEAST 1.10. ***Virus evolution***, v.4, n.1, 2018.
- 25 TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary  
26 genetics analysis version 11. ***Molecular biology and evolution***, 2021, v.38, n.7,  
27 p.3022-3027, 2021.
- 28 TANABE, A. S. "Kakusan: a computer program to automate the selection of a  
29 nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on  
30 multilocus data", ***Molecular Ecology Notes***, v.7, p.962-964, 2007. doi:  
31 10.1111/j.1471-8286.2007.01807. x.
- 32 TANIKAWA, A.; SHINKAI, A.; TATSUTA, H.; MIYASHITA, T. Highly diversified  
33 population structure of the spider *Lycosa ishikariana* inhabiting sandy beach  
34 habitats. ***Conservation genetics***, v. 19, n. 2, p. 255-263, 2018.
- 35 TARAÍLO-GRAOVAC, M.; CHEN, N. Using RepeatMasker to identify repetitive  
36 elements in genomic sequences. ***Current protocols in bioinformatics***, p. 4.10.  
37 1-4.10. 14, 2009.
- 38 TELFER, A. C.; YOUNG, M. R.; QUINN, J.; PEREZ, K.; SOBEL, C. N.; SONES,  
39 J. E.; LEVESQUE-BEAUDIN, V.; DERBYSHIRE, R.; FERNANDEZ-TRIANA, J.;  
40 ROUGERIE, R.; THEVANAYAGAM, A.; BOSKOVIC, A.; BORISENKO, A. V.;  
41 CADEL, A.; BROWN, A.; PAGES, A.; CASTILLO, A. H.; NICOLAI, A.;

- 1 MOCKFORD, B. M. G.; BUKOWSKI, B.; WILSON, B.; TROJAHN, B.; LACROIX,  
2 C. A.; BRIMBLECOMBE, C.; HAY, C.; HO, C.; STEINKE, C.; WARNE, C. P.;  
3 CORTES, C. G.; ENGELKING, D.; WRIGHT, D.; LIJTMAER, D. A.;  
4 GASCOIGNE, D.; MARTICH, D. H.; MORNINGSTAR, D.; NEUMANN, D.;  
5 STEINKE, D.; DEBRUIN, D. D. M.; DOBIAS, D.; SEARS, E.; RICHARD, E.;  
6 DAMSTRA, E.; ZAKHAROV, E. V.; LABERGE, F.; COLLINS, G. E.; BLAGOEV,  
7 G. A.; GRAINGE, G.; ANSELL, G.; MEREDITH, G.; HOGG, I.; MCKEOWN, J.;  
8 TOPAN, J.; BRACEY, J.; GUENTHER, J.; SILLS-GILLIGAN, J.; ADDESI, J.;  
9 PERSI, J.; LAYTON, K. K. S.; D'SOUZA, K.; DORJI, K.; GRUNDY, K.;  
10 NGHIDINWA, K.; RONNENBERG, K.; LEE, K. M.; XIE, L.; LU, L.; PENEV, L.;  
11 GONZALEZ, M.; ROSATI, M. E.; KEKKONEN, M.; KUZMINA, M.; ISKANDAR,  
12 M.; MUTANEN, M.; FATAHI, M.; PENTINSAARI, M.; BAUMAN, M.; NIKOLOVA,  
13 N.; IVANOVA, N. V.; JONES, N.; WEERASURIYA, N.; MONKHOUSE, N.;  
14 LAVINIA, P. D.; JANNETTA, P.; HANISCH, P. E.; MCMULLIN, R. T.; FLORES,  
15 R. O.; MOUTTET, R.; VENDER, R.; LABBEE, R. N.; FORSYTH, R.; LAUDER,  
16 R.; DICKSON, R.; KROFT, R.; MILLER, S. E.; MACDONALD, S.; PANTHI, S.;  
17 PEDERSEN, S.; SOBEK-SWANT, S.; NAIK, S.; LIPINSKAYA, T.; EAGALLE, T.;  
18 DECAËNS, T.; KOSUTH, T.; BRAUKMANN, T.; WOODCOCK, T.; ROSLIN, T.;  
19 ZAMMIT, T.; CAMPBELL, V.; DINCA, V.; PENEVA, V.; HEBERT, P. D. N.;  
20 DEWAARD, J. R. Biodiversity inventories in high gear: DNA barcoding facilitates  
21 a rapid biotic survey of a temperate nature reserve. **Biodiversity Data Journal**,  
22 n.3, 2015.
- 23 TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BASTOS, R. P.; SOARES, T. N.;  
24 GUIMARÃES, L. D.; LIMA, L. P. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in  
25 Brazilian Cerrado: correspondence between population structure and patterns of  
26 human occupation and habitat loss. **Biological Conservation**, v. 139, n. 1-2, p.  
27 37-46, 2007.
- 28 TINOCO, C. F.; LIMA, N. E.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; COLLEVATTI, R. G.  
29 Research and partnerships in studies on population genetics of Neotropical  
30 plants: a scientometric evaluation. **Biochemical Systematics and Ecology**,  
31 v.61, p.357-365, 2015.
- 32 TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple  
33 electropherogram quality analysis. **1st International Conference on**  
34 **Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi** 14th to 16th May  
35 2003. Ribeirão Preto.
- 36 TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Biodiversity in the Neotropics: ecological,  
37  
38  
39
- 37 TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G.  
38 **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e**  
39 **Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
- 40 UETZ, G.W., HALAJ, J., CADY, A.B. Guild structure of spiders in major crops.  
41 **Journal Arachnology**, v.27, p. 270-280, 1999.
- 42 VIEIRA, C.; GONZAGA, M. O. **Behaviour and Ecology of Spiders:**  
43 **Contributions from the Neotropical Region**. Springer Cham, 2017. *E-book*.  
44

- 1 VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer  
2 and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n.2, p. 226-231, 2004.
- 3 WHEELER, W. C.; CODDINGTON, J. A.; CROWLEY, L. M.; DIMITROV, D.;  
4 GOLOBOFF, P. A.; GRISWOLD, C. E.; HORMIGA, G.; PRENDINI, L.; RAMÍREZ,  
5 M.J.; SIERWALD, P.; ALMEIDA-SILVA, L.; ARNEDO, M. A.; SILVA, L. R. B.;  
6 BENJAMIN, S.P.; BOND, J. E.; GRISMADO, C. J.; HASAN, E.; HEDIN, M.;  
7 IZQUIERDO, M. A.; LABARQUE, F. M.; LEDFORD, J.; LOPARDO, L.;  
8 MADDISON, W. P.; MILLER, J. A.; PIACENTINI, L. N.; PLATNICK, N. I.;  
9 POLOTOW, D.; SILVA-DÁVILA, D.; SCHARFF, N.; SZUTS, T.; UBICK, D.; VINK,  
10 C. J.; WOOD, H. M.; ZHANG, J. The spider tree of life: phylogeny of Araneae  
11 based on target-gene analyses from an extensive taxon  
12 sampling. **Cladistics**, v.33, n.6, p.574-616, 2016.
- 13 WILDER, S. M.; RYPSTRA, A.L. Males make poor meals: a comparison of  
14 nutrient extraction during sexual cannibalism and predation. **Oecologia**, v.162,  
15 p.617–625, 2010.
- 16 WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog. Version 19.5**. Natural  
17 History Museum Bern, 2024. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2
- 18 WWF/Unidades de conservação: conservando a vida, os bens e os serviços  
19 ambientais, 2008: Disponível em:  
20 <https://www.wwf.org.br/informacoes/biblioteca/?11320>.
- 21 VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P.; SHIPLEY, P.  
22 MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in  
23 microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535–538, 2004.
- 24 ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F.  
25 Microsatélites: Metodologias de Identificação e Análises. In: TURCHETTO-  
26 ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores  
27 Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Ribeirão Preto:**  
28 **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017, p.94-113.
- 29 ZHANG, Y.; CHEN, J.; TANG, X.; WANG, F.; JIANG, L.; XIONG, X.; WANG, M.;  
30 RONG, M.; LIU, Z.; LIANG, S. Transcriptome analysis of the venom glands of the  
31 Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Zoology**, v.113, p.10–18, 2010.
- 32 ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species  
33 delimitation method with applications to phylogenetic placements.  
34 **Bioinformatics**, v.29, n.22, p.2869-2876, 2013.
- 35  
36  
37  
38  
39  
40

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

## **CAPÍTULO 1**

**IDENTIFICAÇÃO DE ARANHAS LYCOSOIDEA COM USO DO  
GENE COI: Diversidade de espécies em análises de agrupamento**

Este artigo será submetido a Revista Conservation Genetics.

1 Identificação de aranhas Lycosoidea com uso do gene COI: Diversidade de espécies  
2 em análises de agrupamento

3  
4 Analiza Fernanda Cavenagh<sup>1</sup>, Camila Satie Savada<sup>1</sup>, Matheus Pires Rincão<sup>2</sup>,  
5 Antonio Domingos Brescovit<sup>3</sup>, Fernanda Simões de Almeida<sup>1</sup>

6  
7 <sup>1</sup>Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-  
8 Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná  
9 – Brasil

10 <sup>2</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Centro de Ciências Biológicas - Campus Luiz  
11 Meneghel, Bandeirantes, Paraná - Brasil

12 <sup>3</sup>Laboratório de Coleções Zoológicas – Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP - Brasil

## 13 **Resumo**

14 Dados obtidos com o *Barcoding* a partir do COI vem tornando-se uma ferramenta  
15 muito utilizada na identificação molecular de espécies. O presente trabalho foi  
16 conduzido para proporcionar a identificação de 16 espécies de quatro famílias  
17 de Lycosoidea, que estão inseridas em dez Unidades de Conservação do estado  
18 do Paraná, Brasil. Usando cinco análises de agrupamento, mPTP, GMYC,  
19 ASAP, bPTP e ABGD. Foram sequenciadas e analisadas 140 sequências do  
20 COI, revelando 72 haplótipos distintos. As distâncias intraespecíficas  
21 identificaram nove grupos dentro dos parâmetros de limiar de aracnídeos (2 a  
22 3,6%) e sete grupos acima destes valores. Foram identificados uma média de 26  
23 agrupamentos nas análises, evidenciados nas árvores de Neighbor-Joining,  
24 Bayesiana e Máxima Verossimilhança. O estudo é de extrema importância na  
25 identificação de espécies, pois evidenciou diversidade críptica dentre as  
26 morfoespécies analisadas, mostrando a necessidade de incorporar os dados de  
27 identificação molecular nas revisões sistemáticas. O enriquecimento dos bancos  
28 genéticos como proporcionado pelo presente estudo é um passo importante  
29 nesse processo.

30  
31  
32  
33 **Palavras – chave:** Aranhas; ASAP; DNAMt; GMYC.

34

35

36

37

38

39

40

## 1 **Introdução**

2

3

4 Com mais de 51.800 espécies descritas, as aranhas estão entre as mais  
5 diversas ordens de animais (Mora et al. 2011; World Spider Catalog 2024), com  
6 um crescimento, por descrição de novas espécies, ainda exponencial. Em um  
7 levantamento, Brescovit, Oliveira e Santos (2011) observaram uma composição  
8 na região Neotropical de 11.280 espécies de aranhas, aproximadamente 27%  
do total de espécies descritas até 2011.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

Como predadores, as aranhas ocupam uma posição relevante nas teias  
alimentares, exibindo alto potencial como bioindicadores, já que muitas espécies  
são sensíveis a mudanças de seus habitats e fatores ambientais, como  
temperatura e umidade (Wise 1993; Entling et al. 2007; Gerlach, Samways e  
Pryke 2013; Moya-Larano 2013;). A superfamília Lycosoidea é uma das mais  
representativas em número de espécies, composta por sete famílias: Ctenidae,  
Lycosidae, Oxyopidae, Pisauridae, Psecridae, Thomisidae e Trechaleidae  
(Polotow, Carmichael e Griswold 2015; Wheeler et al. 2016), que juntas formam  
um grupo amplamente diversificado e distribuído, composto por mais de 6.250  
espécies (World Spider Catalog 2024).

19

20

21

22

23

24

25

Apesar dessa ampla diversidade ainda estamos distantes de poder dizer  
que identificamos todas as espécies de aranhas. Uma corrida contra o tempo,  
visto que o desenvolvimento humano tem levado a degradação de muitos  
ecossistemas. No Paraná, seu principal Bioma, a Mata Atlântica, possui muito  
pouco de sua vegetação original, e o que resta se encontra fragmentado. O  
isolamento geográfico em pequenos fragmentos coloca em risco a sobrevivência  
de muitas espécies que ali encontram refúgio.

26

27

28

29

30

Contudo, o uso da identificação molecular de espécies com base no DNA  
*barcoding* (Hebert e Ratnasingham; Dewaard 2003; Astrin et al. 2016), pode ser  
uma ferramenta interessante no caso das aranhas, como evidenciado para  
estudos envolvendo *Aglaoctenus lagotis* (Holmberg, 1876) (Macrini et al. 2015),  
em fragmentos de Mata Atlântica no estado de São Paulo.

31

32

O uso do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) do DNAm, tem  
sido amplamente utilizado na última década em pesquisas de biodiversidade

1 (Hebert et al. 2003), sua utilidade já é evidenciada na identificação de aranhas  
2 pelo mundo em todas as fases da vida (Barret e Hebert 2005; Robinson et al.  
3 2009; Astrin et al. 2016; Naseem e Tahir 2016).

4 Informações sobre limites de espécies podem ser obtidas pelo uso de  
5 alinhamentos do COI juntos a algoritmos de agrupamento (Planas, Fernandez-  
6 Montravera e Ribera 2013; Ivanov et al. 2021; Starrett et al. 2022). Conhecimento  
7 este que pode auxiliar na produção de ações de conservação para as aranhas.

8 Diante disso, o objetivo do presente estudo é utilizar análises moleculares  
9 combinadas para promover uma ferramenta de alta aplicabilidade e eficácia,  
10 para caracterizar e identificar molecularmente espécies de aranhas pertencentes  
11 a quatro famílias dentro de Lycosoidea. Espera-se proporcionar o aumento no  
12 de dados que garantam práticas de proteção para o grupo.

## 13 **Material e Métodos**

14 Foram utilizados exemplares pertencentes a 16 espécies das famílias  
15 Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae coletados em dez Unidades de  
16 Conservação localizadas no estado do Paraná: Parque Estadual do Guartelá  
17 (PEG) – Tibagi (24°33'50.10"S 50°15'35.80"O), Parque Estadual Mata do Godoy  
18 (PEMG) – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O), Parque Estadual de Vila  
19 Velha (PEVV) – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O), Parque Municipal  
20 Arthur Thomas (PMAT) – Londrina (23°20'39.00"S 51°08'23.00"O), Parque  
21 Nacional do Iguaçu (PNI) – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O),  
22 Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) – Icaraíma (23°23'45.10"S  
23 53°49'02.50"O), Parque Nacional de Superagui (PNS) – Guaraqueçaba  
24 (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O), Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (PNSH) -  
25 Matinhos (25°48'42.30"S 48°33'47.50"O), Reserva Biológica das Perobas (RBP)  
26 – Tuneiras do Oeste (23°51'30.79"S 52°45'31.28"O) e Reserva Fazenda Nossa  
27 Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS) - Santo Antônio da Platina (23°18'03.00"S  
28 50°06'02.30"O) (**Tabela 1**).

30 Os espécimes foram identificados morfológicamente e depositados na  
31 coleção aracnológica do Laboratório de Coleções Zoológicas no Instituto  
32 Butantan (IBSP, curador A.D. Brescovit) em São Paulo/SP, Brasil.

1 O DNA genômico foi extraído do tecido muscular da perna das aranhas,  
2 a partir do protocolo com fenol-clorofórmio de Almeida, Fungaro e Sodré (2001).  
3 A amplificação parcial da sequência do gene mitocondrial citocromo c oxidase  
4 subunidade I (COI) foi realizada de acordo com Wheeler et al. (2016), usando o  
5 par de *primers* CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3' (CO1-F) e  
6 GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3' (CO1-R) (Dick et al. 2004). A análise  
7 da qualidade foi realizada utilizando o *software online* Electropherogram Quality  
8 Analysis (Togowa e Brigido 2003). As sequências obtidas foram comparadas  
9 com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com uso do  
10 programa BLAST (Altschul et al. 1997) e no banco de dados BOLD  
11 (Ratnasingham e Hebert 2007) (<http://www.boldsystems.org/>). Posteriormente,  
12 estas sequências foram alinhadas e editadas manualmente no *software* MEGA  
13 11 (Tamura, Stecher e Kumar 2021) e incorporadas nas análises de distância  
14 genética intra e interespecíficas, baseadas no modelo Kimura-2-Parâmetros  
15 (Kimura 1980).

16 Devido a lacuna existente nos bancos de dados, com relação as  
17 espécies da região Neotropical, a identificação das sequências se manteve  
18 através da análise de morfologia realizada no Instituto Butantan (IBSP, curador  
19 A. D. Brescovit).

20 As análises de agrupamento foram realizadas observando as formações  
21 das unidades taxonômicas operacionais baseadas nos dados moleculares  
22 (MOTU's) junto aos diferentes algoritmos apresentados a seguir. Cinco análises  
23 de delimitação de espécies independentes foram aplicadas aos alinhamentos de  
24 COI-3P: Generalized Mixed Yule Coalescence (GMYC) (Pons et al. 2006;  
25 Fujisawa e Barraclough 2013), Poisson Tree Process Method (mPTP) (Kapli et  
26 al. 2017), Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) (Zhang et al. 2013) com  
27 visualização Phylomap, Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre  
28 et al. 2012) e Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) (Puillandre et  
29 al. 2021). Os arquivos necessários para os algoritmos citados, foram construídos  
30 nos *softwares* Kakusan 3 (Tanabe 2007), MEGA 11 (Tamura, Stecher e Kumar  
31 2021), Beast / Beauti v1.10.4 (Suchard et al. 2018) e as respectivas árvores  
32 Bayesianas (BI) (Mr Bayes) e Máxima Verossimilhança (ML) (RaxML) geradas na  
33 plataforma CIPRES (Miller, Pfeiffer e Schwartz 2010)

1 (<https://www.phylo.org/index.php/>). Os programas de análises como  
2 TreeAnnotator (Drummond e Rambaut 2007), Tracer (Rambaut et al. 2018) e Fig  
3 Tree (Rambaut 2010) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), foram usados  
4 vinculados ao pacote de *software* do Beast (Suchard et al. 2018). E as árvores  
5 foram analisadas e editadas no Fig Tree e no Adobe Photoshop CS6.

**Tabela 1** – Famílias e espécies analisadas. Os números representam a quantidade de espécimes por local de coleta.

Família	Espécie	Locais de coleta									
		PEMG	PNI	PNIG	PNS	PEVV	PNSH	PEG	PMAT	RBP	RFPS
<b>Ctenidae</b>	<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891				05	05	05				
	<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)	06	06		05	05					
	<i>Guasuctenus longipes</i> (Keyserling, 1891)				06	06					
	<i>Isoctenus coxalis</i> (FO Pickard-Cambridge, 1902)				06	06					
	<i>Isoctenus janeirus</i> (Walckenaer, 1837)				06		06				
	<i>Isoctenus herteli</i> (Mello-Leitão, 1947)					08					
	<i>Isoctenus strandi</i> Mello-Leitão, 1936						05				
	<i>Isoctenus ordinario</i> Polotow & Brescovit, 2009	04									
	<i>Parabatinga brevipes</i> (Keyserling, 1891)			10							
<b>Lycosidae</b>	<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	05			05						
	<i>Lycosa nordenskjöldi</i> Tullgren, 1905			05	04						
	<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	05	05						05		
<b>Thomisidae</b>	<i>Tmarus</i> sp. Simão, 1875							04		04	
<b>Trechaleidae</b>	<i>Trechaleoides biocellata</i> (Mello-Leitão, 1926)		05								
	<i>Trechaleoides keyserlingi</i> (F.O. Pickard-Cambridge, 1903)								02		
	<i>Trechalea</i> sp. Thorell, 1869		04								
<b>Total</b>		20	20	15	37	30	15	04	02	05	04

Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG), Parque Nacional do Iguaçu (PNI), Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG), Parque Nacional de Superagui (PNS), Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (PNSH), Parque Estadual do Guartelá (PEG), Parque Municipal Arthur Thomas (PMAT), Reserva Biológica das Perobas (RBP) e Reserva Fazenda Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS).

## 1 **Resultados e Discussão**

2

3

### ANÁLISE DE LIMIAR DE DELIMITAÇÃO E HAPLOTIPAGEM

4

5 Foram sequenciadas e analisadas 140 sequências do COI sendo editadas  
6 em aproximadamente 520pb com mínimo de 468pb. A análise de haplótipos  
7 revelou um total de 72 haplótipos distintos para o conjunto de dados (Fig. S1)  
8 (Tabela S1). As frequências de nucleotídeos foram de A = 25,07%, T/U =  
9 42,89%, C = 11,02% e G = 21,02%, o que mostra um viés de composição para  
10 AT= 67,9%, o que fica bem próximo ao relatado para aranhas (Ayoub et al. 2005;  
Astrin et al. 2006; Wood, Griswold e Spicer 2007; Astrin et al. 2016).

11

12 Os dados mostraram que os 16 grupos apresentaram valores variando de  
13 0,09% até 7,97% (Tabela 2) de distância intraespecífica. Sugerindo que algumas  
14 morfoespécies agrupam mais de um táxon, já que os parâmetros de limiar de  
15 delimitação de aracnídeos foram estimados entre 2% e 3,6% (Barrett e Hebert  
16 2005; Robinson et al. 2009; Čandek e Kuntner 2014; Astrin et al. 2016; Gaikwad,  
Warudkar e Shouche 2016; Tyagi et al. 2019).

17

18 Embora múltiplos estudos tenham tratado o limite de delimitação da fauna  
19 de aranhas em todo o mundo, a avaliação atual mostra que apesar dos  
20 parâmetros mais amplos os indivíduos se agrupam respeitando uma barreira de  
21 2% aproximadamente.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 **Tabela 2** – Distância intraespecífica entre espécies analisadas de Ctenidae,  
 2 Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae. Gp: grupos.

Grupos (Gp)	Distância intraespecífica (d)	Desvio padrão (SE)
<b>Ctenidae</b>		
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	2,12%	0,45%
Gp <i>Ctenus medius</i>	4,69%	0,74%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	4,28%	0,73%
Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	6,46%	1,01%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	0,38%	0,14%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	5,60%	0,83%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	0,43%	0,19%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	0,09%	0,10%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	0,36%	0,19%
<b>Lycosidae</b>		
Gp <i>Trochosa</i> sp.	3,61%	0,67%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	4,94%	0,75%
Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	1,40%	0,37%
<b>Thomisidae</b>		
Gp <i>Tmarus</i> sp.	3,38%	0,50%
<b>Trechaleidae</b>		
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	2,98%	0,60%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	5,12%	1,08%
Gp <i>Trechalea</i> sp.	7,97%	1,40%

3

4 As análises filogenéticas realizadas usando o modelo de Kimura-2-  
 5 Parâmetros (KP2) indicam os possíveis conjuntos de espécimes na árvore de  
 6 Neighbor-Joining (NJ), onde novos grupos são evidenciados (Tabela 3),  
 7 observando 26 agrupamentos ao invés de 16 (Tabela 2), que apresentam valores  
 8 de distância intragrupo inferiores à 2% (Fig. 1). O que indica que possam ser  
 9 Unidades Evolutivas Significantes independentes, ou seja espécies diferentes.

10

11

12

13

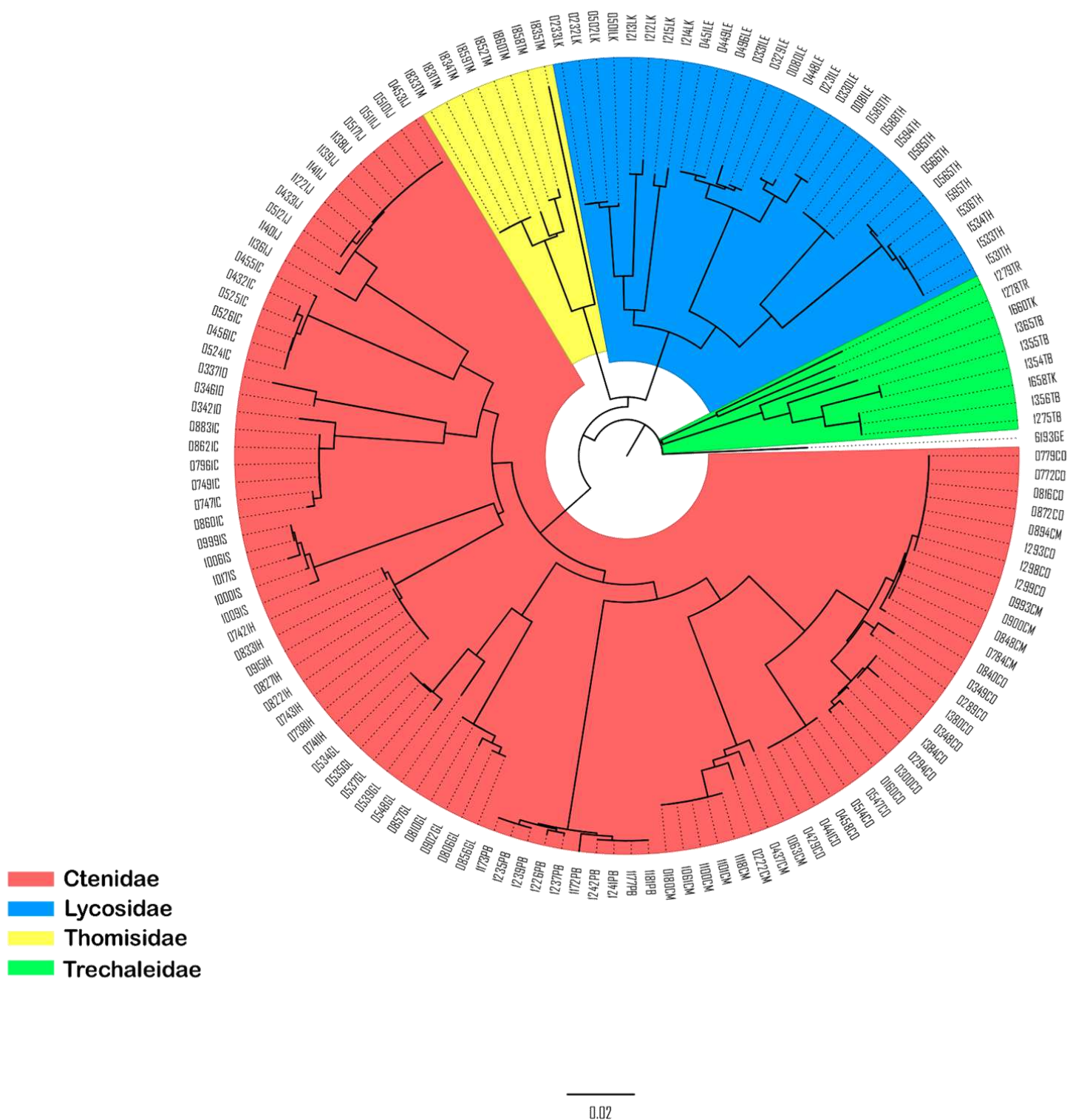
14

15

16

1 **Fig. 1** Árvore de inferência Neighbor-Joining (NJ) composta pelos 140 indivíduos  
 2 representando as quatro famílias (Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e  
 3 Trechaleidae); o ramo em branco mostra o grupo externo (GE) *Dolomedes*  
 4 *angustivirgatus* - GACS6193-19, Psauridae), mostrando a distribuição dos  
 5 espécimes em cada ramo segundo as análises geradas no modelo genético de  
 6 Kimura 2 Parâmetros (KP2).

7



1 **Tabela 3** – Distância intraespecífica usando os novos conjuntos de espécimes  
 2 identificados na árvore de Neighbor-Joining (NJ). Gp: grupos

Grupos (Gp)	Distância intraespecífica (d)	Desvio padrão (SE)
<b>Ctenidae</b>		
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	0,91%	0,28%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	0,00%	0,00%
Gp <i>Ctenus medius</i>	0,86%	0,26%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	0,34%	0,21%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	1,31%	0,34%
Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	1,30%	0,54%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	0,38%	0,13%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	0,60%	0,21%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	0,20%	0,15%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	0,43%	0,19%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	0,09%	0,09%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	0,36%	0,18%
<b>Lycosidae</b>		
Gp <i>Trochosa</i> sp. 1	0,00%	0,00%
Gp <i>Trochosa</i> sp. 2	0,16%	0,12%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	0,11%	0,10%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	0,43%	0,31%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	0,86%	0,43%
Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	1,40%	0,37%
<b>Thomisidae</b>		
Gp <i>Tmarus</i> sp. 1	1,27%	0,38%
Gp <i>Tmarus</i> sp. 2	0,00%	0,00%
<b>Trechaleidae</b>		
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	0,00%	0,00%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	0,00%	0,00%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	0,00%	0,00%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	0,00%	0,00%
Gp <i>Trechalea</i> sp. 1	0,00%	0,00%
Gp <i>Trechalea</i> sp. 2	0,00%	0,00%

3

4 Com relação a distância entre os agrupamentos, usando como modelo  
 5 o valor de 4%, estipulado por Barrett e Hebert (2005), para diferenciação  
 6 interespecífica foram observados alguns valores relevantes. Levando em  
 7 consideração a primeira análise dos 16 agrupamentos, classificados pela  
 8 identificação morfológica somente, *C. ornatus* em relação ao grupo *C. medius*  
 9 apresenta uma distância de  $6,41 \pm 0,93\%$ , que apesar de estar acima do limiar de  
 10 4%, mostra uma proximidade das espécies bem mais evidente que as demais  
 11 (Tabela S2), sendo este o segundo menor valor; quando analisamos o grupo de  
 12 *T. keyserlingi* com o grupo de *T. biocellata* podemos identificar um valor de  
 13  $3,77 \pm 0,65\%$  referenciando uma possível identificação errônea do espécime  
 14 (Tabela 4).

1 **Tabela 4** – Distâncias interespecíficas parciais de algumas espécies referentes  
2 as famílias Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae

Espécies 1	Espécies 2	Distância interespecífica (d)	Desvio Padrão (SE)
<i>Ctenus ornatus</i>	<i>Ctenus medius</i>	6,41%	0,93%
<i>Trechaleoides keyserlingi</i>	<i>Trechaleoides biocellata</i>	3,77%	0,65%
<i>Trochosa</i> sp.	<i>Ctenus medius</i>	17,35%	1,99%
<i>Tmarus</i> sp.	<i>Guasuctenus longipes</i>	13,34%	1,61%

3  
4 Quando a análise é refeita usando a divisão de grupos que é  
5 apresentada na árvore NJ (Fig. 1), pode-se notar alguns valores importantes  
6 (Tabela S3). Em Ctenidae o grupo de *C. ornatus* 1 composto pelos espécimes  
7 de *C. ornatus* das populações de PEVV, PNI e PEMG, além dos *C. medius* do  
8 PEVV, mostram uma distância de  $3,95 \pm 0,86\%$  com relação ao grupo de *C.*  
9 *ornatus* 2 (população de *C. ornatus* do PNS). Entretanto ao ser comparado com  
10 o grupo *C. medius* (população *C. medius* do PNS e PNSH) temos uma distância  
11 significativa de  $9,11 \pm 1,45\%$  e  $9,96 \pm 1,56\%$  respectivamente (Tabela 5) (Tabela  
12 S4).

13

14 **Tabela 5** – Distância interespecífica parcial entre alguns grupos usando os novos  
15 conjuntos de espécimes identificados na árvore de Neighbor-joining (NJ). Gp:  
16 grupo.

Espécies 1	Espécies 2	Distância interespecífica (d)	Desvio Padrão (SE)
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	3,95%	0,86%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Ctenus medius</i>	9,11%	1,45%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	9,96%	1,56%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	5,38%	1,05%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	7,70%	1,34%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	7,95%	1,32%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	6,97%	1,24%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Tmarus</i> sp 2	9,72%	1,38%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	4,93%	1,04%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	4,23%	0,93%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	2,86%	0,82%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	7,97%	1,39%

17

18

1            Para Lycosidae foi analisado dois grupos que já apresentaram pontos  
2 relevantes em outros estudos (Cavenagh 2020; Cavenagh et al. 2022), que  
3 demonstrou a mesma divisão de espécimes. Os grupos de *L. nordenskjoldi* se  
4 agruparam da mesma maneira em análises citogenéticas na distribuição do  
5 DNAr 18S, reafirmando subpopulações. Os valores de distâncias entre os grupos  
6 foram bem expressivos ( $5,38\pm 1,05\%$  a  $7,95\pm 1,32\%$ ) (Tabela 5) (Tabela S4).  
7 Assim como podemos notar nos grupos de *Trochosa* sp. em que as populações  
8 se alocaram da mesma forma que foi observado no trabalho de Cavenagh (2020)  
9 que mostra dois grupos de cariótipos distintos distribuídos em três populações.  
10 A distância interespecífica também foi significativa ( $6,97\pm 1,24\%$ ) (Tabela 5)  
11 (Tabela S4).

12            A espécie analisada para Thomisidae não estava definida, mas sim  
13 classificada somente pelo gênero, *Tmarus* sp., o que foi possível observar nas  
14 análises é que se trata de duas espécies, dentro do mesmo gênero. Dentro do  
15 limiar de delimitação proposto, podemos notar que são espécies próximas  
16 ( $3,38\pm 0,50\%$ ) (Tabela 2), contudo, o ramo da árvore de NJ evidencia um  
17 indivíduo, que se separa e apresenta uma distância significativa de  $9,72\pm 1,38\%$   
18 com relação aos demais (Tabela 5).

19            A família Trechaleidae foi a que mais demonstrou ramos distintos na  
20 árvore de NJ (Fig.1), *T. biocellata* mostrar um limiar dos mais baixos na análise  
21 da família (Tabela 4), e evidência que alguns espécimes podem estar  
22 erroneamente classificados. Como dito anteriormente, os grupos de *T. biocellata*  
23 e *T. keyserlingi* possuem uma distância significativa.

24            Referente a alocação de um dos espécimes da população de PMAT de  
25 *T. keyserlingi*. junto aos indivíduos de *T. biocellata* do PNI a análise de distância  
26 intraespecífica mostra 0%, evidenciando a compatibilidade dos espécimes  
27 (Tabela 3) (Tabela S4). Para eficácia de qual das espécies estaria correta, foi  
28 feito a análise no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),  
29 com uso do programa BLAST (Altschul et al. 1997), apesar de escasso para  
30 muitas das espécies aqui analisadas, as então citadas possuem sequências  
31 disponíveis, onde se pode observar uma identificação por porcentagem de

1 identidade de 99,51% para *T. biocellata* - sob acesso KY018027.1 (Wheeler et  
2 al. 2016) (Fig. 1).

3 Em concomitância aos dados, as distâncias interespecíficas dos três  
4 grupos de *T. biocellata* com relação ao indivíduo restante de *T. keyserlingi* indica  
5 que são espécies diferentes ( $5,36 \pm 1,12\%$  -  $6,06 \pm 1,21\%$  -  $5,12 \pm 1,06\%$   
6 respectivamente). Já as distâncias entre os grupos de *T. biocellata* mostram que  
7 apesar de ocupar ramos distintos na árvore de NJ ainda se encontram no mesmo  
8 grupo, com uma porcentagem de  $2,86 \pm 0,82\%$  a  $4,93 \pm 1,04\%$  (Tabela 5).

9 Os dois indivíduos de *Trechalea* sp. estão presentes em ramos  
10 diferentes, com uma distância intraespecífica de  $7,97 \pm 1,40\%$ , o que pode indicar  
11 que sejam espécies diferentes dentro do mesmo gênero (Tabela 2) (Fig. 1).

12 Diante das primeiras análises já se observa a relevância dos dados,  
13 mostrando que o gene mitocondrial (COI) - identifica os espécimes em diferentes  
14 regiões (Unidades de Conservação) (Blagoev et al. 2015; Astrin et al. 2016).  
15 Reforçando que para compreensão dos padrões de diversidade e os processos  
16 que o seguem é necessária uma identificação correta das espécies e que o COI  
17 pode atuar como essa ferramenta (Domènech et al. 2022), principalmente em  
18 grupos tão diversos e abundantes quanto as aranhas (Peters e  
19 Wassenberg 1983; Chapman 2009).

## 20 ANÁLISE DE ÁRVORES E ESTIMATIVA DE MOTU'S

21 Para estimar a diversidade genética usando sequências de gene  
22 mitocondrial, foi utilizado métodos de delimitação de múltiplas espécies, sendo  
23 utilizados os três métodos de construção de árvores Neighbor-Joining (NJ),  
24 Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML). As três metodologias  
25 evidenciaram topologias semelhantes, com agrupamento coeso para 26 grupos  
26 com valores altos de *bootstrap* (Fig. 2).

27 Usando os algoritmos GMYC, mPTP, bPTP, ABGD e ASAP as  
28 topologias mostraram algumas divisões diferentes entre si, contudo muito  
29 próximas dos valores pré observados na nova distribuição de 26 agrupamentos,  
30 mas em todos os casos excedeu a lista de espécies baseada na taxonomia  
31 atual de Lycosoidea. O número de MOTU em GMYC foi de 25 (ou 34 espécies,

1 incluindo grupos que apresentam um único espécime); mPTP mostrou 25; ASAP  
2 identificou exatamente as 26 MOTU's já observadas; e bPTP e Phylomap com  
3 51 MOTU's, com valores de suporte de ramo muito baixos, porém foram os  
4 algoritmos com maiores variações dos grupos; já o algoritmo ABGD mostrou 21  
5 MOTU's (Fig. 2), localizando um GAP de 0,099, de partição inicial com distancia  
6 máxima anterior de 0,0077, usando a medida de distância Kimura (K80) de Min  
7 Lope (inclinação mínima) de 1.1 (Fig. 3).

8 O *Barcode Gap* que o ABGD mostra, pode ser observado no histograma  
9 que identifica a distribuição genética de p-distancias pareadas, demonstrando a  
10 presença de uma suposta lacuna no nível de 3,0% de substituições no gene COI,  
11 que corresponde ao limite entre as comparações intragrupo e entre grupos  
12 (Fig.3A). Outra suposta lacuna é observada ao nível 6 a 8% de substituições no  
13 gene COI, que corresponde às comparações entre complexos de espécies  
14 intimamente relacionadas ( Fig. 3A).

15 Um quadro semelhante é observado na distribuição das diferenças  
16 ordenadas aos pares, com um aumento repentino na inclinação nas  
17 proximidades do limite de 3,0% de substituições e uma inclinação menos  
18 pronunciada no nível de 6,0% (Fig. 3B). No geral, a única lacuna distinta na  
19 distribuição das distâncias genéticas pareadas nas famílias de Lycosoidea foi  
20 registrada ao nível de 3,0% de substituições.

21 A maioria das discordâncias entre a atual taxonomia de Lycosoidea e as  
22 listas MOTU (Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares), que  
23 representam supostas 'espécies' resultaram de uma superestimativa do número  
24 de espécies. Isto sugere uma diversidade não reconhecida e uma taxonomia  
25 incompleta de certos grupos de espécies, e/ou reflete a tendência de divisão  
26 excessiva de alguns dos métodos de delimitação de espécies (especialmente o  
27 do PTP).

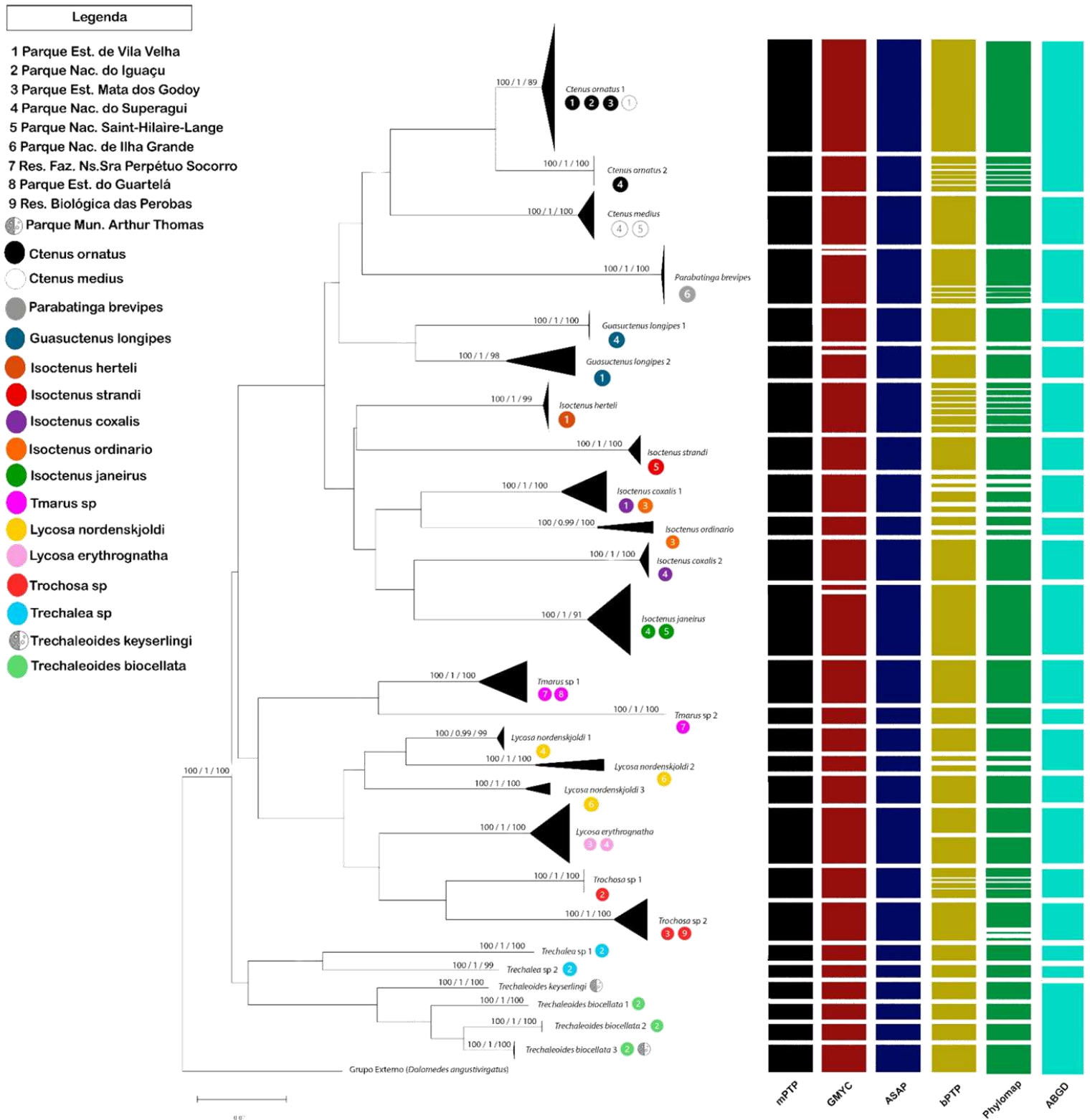
28

29

30

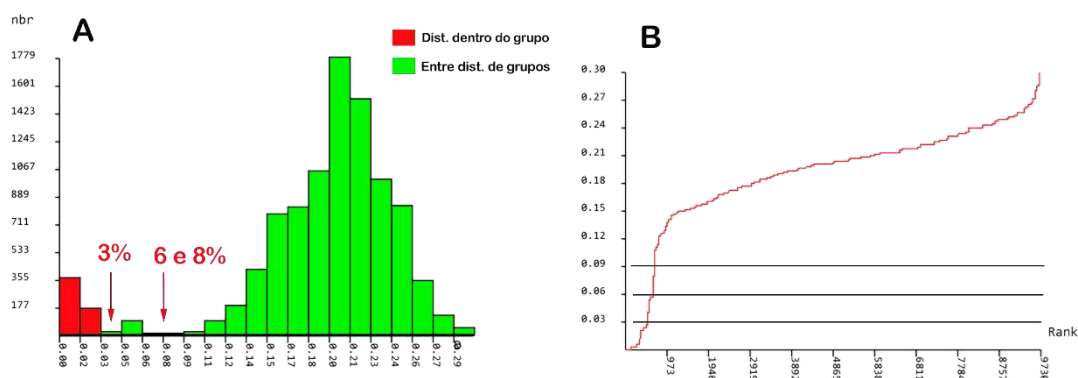
31

**Fig. 2** Árvore Neighbor-Joining (NJ) colapsada, usada como árvore resumo para identificação dos grupos apresentados aos espécimes previamente definidos por identificação morfológica e divididos em novos grupos relacionados ao teste de distância intraespecífica pelo método de Kimura-2-Parâmetros (KP2) – apoio a Tabela S4.



**Legenda:** As divisões das barras em cores mostram os grupos definidos pelos algoritmos de identificação de espécies (mPTP, GMYC, ASAP, bPTP, Phylomap e ABGD) usando o modelo genético Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I). Os valores presentes nos ramos representam a viabilidade de cada grupo de acordo com as árvores de NJ (KP2), Bayesiana (BI) (HKY+G+I) e Máxima Verossimilhança (ML) (HKY+G+I), respectivamente.

1 **Fig. 3** Divergência genética pareada e delimitação de espécies em famílias de  
 2 Lycosoidea: (A) - histograma mostrando a distribuição de divergências genéticas  
 3 pareadas para sequências COI de Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e  
 4 Trechaleidae; (B) – distribuição das diferenças ordenadas aos pares calculadas  
 5 com ABGD; a linha vermelha indica a frequência acumulada dos valores de  
 6 distância delimitados com ABGD (p-distâncias não corrigidas).



7 Com relação ao algoritmo bPTP e Phylomap, que levam em consideração  
 8 o número de substituições na estimativa para o limite entre as espécies, usando  
 9 a árvore ML, devido à alta taxa de mutações dos grupos apresentados, dividiram  
 10 muitos dos grupos em um único indivíduo, desmembrando muitos dos ramos  
 11 estabelecidos em todas as árvores (NJ, BI e ML). Com a maioria dos valores de  
 12 suporte muito baixos (0,233 a 0,847) e com somente nove grupos de valores  
 13 maiores que 0,9, que é considerado um valor de confiabilidade do suporte dos  
 14 ramos. Mostrando que apesar de considerado um método muito conservado  
 15 para essas análises, neste grupo em particular não obteve sucesso (Medeiros  
 16 2022). O método de GMYC, por exemplo, que parte de uma árvore ultramétrica  
 17 que introduz informação da ancestralidade à análise, refletiu maior confiabilidade  
 18 (Monaghan et al. 2009).

19 Os métodos de delimitação apesar de apresentarem valores variados de  
 20 MOTU reafirmaram grupos diagnosticados nos três tipos de árvores, ou seja,  
 21 casos de discordância entre a classificação baseada na morfologia e a  
 22 delimitação de espécies baseada no COI. O primeiro caso inclui os *C. medius* de  
 23 PEVV junto aos demais *C. ornatus* (PEVV, PNI e PEMG), que possuem dois  
 24 morfotipos morfologicamente distintos. Outro caso foi um espécime de *I.*  
 25 *ordinario* PEMG que se agrupa a um dos grupos de *I. coxalis* do PEVV, essas  
 26 espécies são distinguidas em uma relação de caracteres morfológicos, já que

1 seu morfotipo é bem parecido, contudo os métodos de delimitação aqui aplicados  
2 não conseguiram reconhecê-las como grupos independentes; e o indivíduo de  
3 *T. keyserlingi* PMAT aos exemplares de *T. biocellata* PNI, já citado.

4 Esses resultados fornecem algumas evidências em relação a aplicação  
5 do COI juntamente com métodos alternativos de delimitação de espécies. Em  
6 comparação aos resultados das cinco abordagens, aplicando a suposta lacuna  
7 do *Barcode Gap* ao nível de 3,0% de substituições, resulta na detecção de 23  
8 MOTU's, que ainda assim não são congruentes com taxonomia baseada em  
9 morfologia atualmente existente. Ao mesmo tempo, o limite formal proposto de  
10 2,0 a 3,6% reconhece apenas 9 espécies e subestima significativamente a  
11 diversidade nos complexos de espécies *I. ordinario*, *L. nordenskjoldi* e *Trochosa*  
12 sp. entre outros. Esses resultados ressaltam que o uso do DNAmT (COI) é viável  
13 e promissor na diferenciação de espécies de aracnídeos (Astrin et al. 2006;  
14 Blagoev et al. 2013; Hamilton et al. 2014; Čandek e Kuntner 2015; Macrini et al.  
15 2015).

16 Grande parte dos algoritmos propuseram conjuntos altamente  
17 semelhantes de MOTU's. Ao mesmo tempo, nossos resultados sugerem que os  
18 esquemas resultantes de bPTP e Phylomap demonstram uma clara tendência a  
19 divisão excessiva, reconhecendo quase duas vezes mais MOTU's do que os  
20 demais ou do limite de 3,6%. O que vem sendo avaliado em alguns estudos  
21 teóricos e empíricos, que os métodos baseados em PTP, muito provavelmente  
22 estão refletindo divisões populacionais ao invés de divergências de espécies, o  
23 que leva ao excesso de divisões (Xu et al. 2019; Grummer et al. 2014; Firkowski  
24 et al. 2016; Pie et al. 2019).

25 Todos os métodos de delimitação foram aplicados para determinar a  
26 robustez dos resultados obtidos mediante as análises de diversidade intra e  
27 interespecíficas. Diante dos resultados podemos observar alguns possíveis  
28 cenários: espécies que podem compor complexos de espécies crípticas, que são  
29 estimadas morfologicamente idênticas, mas que não inter cruzam e diferem em  
30 outras características (Zang e Li 2014; Satler, Carstens e Hedin 2013; Tyagi et  
31 al. 2019); ou uma amostragem incompleta que impede considerar o contínuo da  
32 divergência genética ao longo da distribuição geográfica da população (Bond et

1 al. 2001); ou populações compostas por espécies que estejam em estágio inicial  
2 na apresentação de diferenças comportamentais que acabam por diminuir o  
3 fluxo genético sem restringi-lo totalmente ainda (De Busschere e Hendrickx  
4 2013).

5 Por se tratar de um conjunto de grupos de diferentes famílias e  
6 conseqüente espécies, as ocorrências de todas as alternativas acima são  
7 adequadas. Onde a biblioteca de COI não apenas irá facilitar a identificação de  
8 amostras únicas, bem como facilitará a automatização da identificação de  
9 amostras em massa, com o uso de sequenciamento de alto rendimento, por  
10 exemplo, para projetos de catalogação em maiores proporções.

## 11 **Conclusão**

12 Os resultados deste trabalho apresentam um estudo importante para a  
13 identificação das espécies de aranhas presentes em diferentes regiões do  
14 estado do Paraná, bem como na caracterização da diversidade genética destas  
15 populações. A descoberta de altos níveis de diversidade intraespecífica de  
16 mtDNA fornece informações de táxons crípticos que devem ser investigados  
17 mais detalhadamente usando dados de nível genômico. Como as aranhas  
18 possuem uma alta diversidade e posição importante nas teias alimentares, a  
19 proposta de colaboração na construção de dados envolvendo espécies  
20 identificadas por especialistas de coleções permanentes, juntamente a registros  
21 nos bancos de dados genéticos de sequências depositadas, é um passo de  
22 importante para a pesquisa de biodiversidade das aranhas em modo geral, mas  
23 principalmente nas Unidades de Conservação do Estado do Paraná.

## 24 **Referências**

25 Almeida FS, Fungaro MHP, Sodré LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of  
26 genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae)  
27 from the Tibagi River, Brazil. *J. Zool.* 253(1):113-120

28 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ  
29 (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database  
30 search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402

31 Astrin JJ, Höfer H, Spelda J, Holstein J, Bayer S, Hendrich L, Huber BA, Kielhorn  
32 KH, Krammer HJ, Lemke M, Monje JC, Morini re J, Rulik B, Petersen M, Janssen

- 1 H, Muster C (2016) Towards a DNA barcode reference database for spiders and  
2 harvestmen of Germany. PloS one 11(9): e0162624.
- 3 Astrin JJ, Huber BA, Misof B, Kluetsch CF (2006) Molecular taxonomy in pholcid  
4 spiders (Pholcidae, Araneae): evaluation of species identification methods using  
5 CO1 and 16S rRNA. Zool. Scr. 35(5):441-457
- 6 Ayoub NA, Riechert SE, Small RL (2005) Speciation history of the North  
7 American funnel web spiders, *Agelenopsis* (Araneae: Agelenidae): Phylogenetic  
8 inferences at the population–species interface. Mol. Phylogenet. Evol. 36(1):42-  
9 57
- 10 Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. Can.  
11 J. Zool. 491(83):481–491
- 12 Blagoev GA, Nikolova NI, Sobel CN, Hebert PD, Adamowicz SJ (2013) Spiders  
13 (Araneae) of Churchill, Manitoba: DNA barcodes and morphology reveal high  
14 species diversity and new Canadian records. BMC Ecol. 13(44):1-17
- 15 Blagoev GA, De Waard JR, Ratnasingham S, De Waard SL, Lu L, Robertson  
16 J, Telfer AC, Hebert PDN (2015) Untangling taxonomy: a DNA barcode reference  
17 library for Canadian spiders. Mol. Ecol. Res. 16(1):325–341.  
18 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12444>.
- 19 Bond JE, Hedin MC, Ramirez MG, Opell BD (2001) Deep molecular divergence  
20 in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal  
21 dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. Mol. Ecol. 10(4):899-910
- 22 Brescovit AD, De Oliveira U, Dos Santos AJ (2011) Aranhas (Araneae,  
23 Arachnida) do Estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e  
24 estado do conhecimento. Biota Neotrop. 11(1a):1-31
- 25 Čandek K, Kuntner M (2015) DNA barcoding gap: reliable species identification  
26 over morphological and geographical scales. Mol. Ecol. Res 15(2):268-277
- 27 Cavenagh AF (2020) Estudo Citogenético em Espécies de Aranhas  
28 Pertencentes à Família Lycosidae (Arachnida, Araneae). Dissertação (Mestrado  
29 em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina – UEL,  
30 Londrina
- 31 Cavenagh AF, Rincão MP, Dias FC, Brescovit AD, Dias AL (2022) Chromosomal  
32 diversity in three species of *Lycosa* Latreille, 1804 (Araneae, Lycosidae):  
33 Inferences on diversification of diploid number and sexual chromosome systems  
34 in Lycosinae. Genet. Mol Biol 45
- 35 Chapman AD (2009) Numbers of Living Species in Australia and the World,  
36 Vol. 2, p. 84. Toowoomba, Australia: Heritage. <https://doi.org/10.1177/135>.
- 37 De Busschere C, Hendrickx F (2013) Does behavioral isolation prevent  
38 interspecific mating within a parallel ecotypic wolf spider radiation from the  
39 Galápagos?. J Arachnol 41(1):25-30

- 1 Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E (2004) Long-distance gene  
2 flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini)  
3 revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Mol Ecol*  
4 13(12):3775-3785
- 5 Domènech M, Malumbres-Olarte J, Enguádanos A, Múrria C, Arnedo MA (2022)  
6 What DNA barcodes reveal: microhabitat preference, hunting strategy and  
7 dispersal ability drive genetic variation across Iberian spider species. *Insect*  
8 *Conserv Divers* 15(2):248-262
- 9 Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by  
10 sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214
- 11 Entling W, Schmidt MH, Bacher S, Brandl R, Nentwig W (2007) Niche properties  
12 of Central European spiders: Shading, moisture, and the evolution of the habitat  
13 niche. *Glob Ecol Biogeogr* 16(4):440–448
- 14 Firkowski CR, Bornschein MR, Ribeiro LF, Pie MR (2016) Species delimitation,  
15 phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the  
16 southern Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol* 100:345–360
- 17 Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting species using single-locus data  
18 and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and  
19 evaluation on simulated data sets. *Syst Biol* 62(5):707-724
- 20 Gaikwad S, Warudkar A, Shouche Y (2017) Efficacy of DNA barcoding for the  
21 species identification of spiders from Western Ghats of India. *Mitochondrial DNA*  
22 *Part A* 28(5):638-644
- 23 Gerlach J, Samways M, Pryke J (2013) Terrestrial invertebrates as bioindicators:  
24 an overview of available taxonomic groups. *J Insect Conserv* 17:831-850
- 25 Grummer JA, Bryson RW, Reeder TW (2014) Species delimitation using Bayes  
26 factors: Simulations and application to the *Sceloporus scalaris* species group  
27 (Squamata: Phrynosomatidae). *Syst Biol* 63:119–133
- 28 Hamilton CA, Hendrixson, BE, Brewer MS, Bond JE (2014) An evaluation of  
29 sampling effects on multiple DNA barcoding methods leads to an integrative  
30 approach for delimiting species: a case study of the North American tarantula  
31 genus *Aphonopelma* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). *Mol*  
32 *Phylogenet Evol* 71:79-93
- 33 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003) Biological identifications  
34 through DNA barcodes. *Proc Royal Soc B* 270(1512):313–321.
- 35 Ivanov V, Marusik Y, Pétilion J, Mutanen M (2021) Relevance of ddRADseq  
36 method for species and population delimitation of closely related and widely  
37 distributed wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Sci Rep* 11(1):1-14

- 1 Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A, Flouri T (2017)  
2 Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under  
3 maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinf* 33(11):1630-1638
- 4 Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base  
5 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*  
6 16(2):111-120
- 7 Macrini CMT, Peres EA, Solferini VN (2015) Cryptic diversity of *Agloactenus*  
8 *lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic rainforest: evidence from  
9 microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *J App Biol Biotechol* 3:009-  
10 014
- 11 Medeiros RS (2022) Diversidade e Filogenia do complexo *Laurencia*  
12 (Ceramiales, Rhodophyta) no Atlântico tropical e subtropical com ênfase na  
13 costa da Venezuela. 2022. 171f. Dissertação (Mestrado em Botânica na área de  
14 Biologia de Algas) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo
- 15 Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway  
16 for inference of large phylogenetic trees. *In: Proceedings of the Gateway*  
17 *Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, p. 1-8
- 18 Monaghan MT, Wild R, Elliot M, Fujisawa T, Balke M, Inward DJ, Lees DC,  
19 Ranaivosolo R, Eggleton P, Barraclough TG, Vogler AP (2009) Accelerated  
20 species inventory in Madagascar using coalescent-based models of species  
21 delineation. *Syst Biol* 58(3):298-311
- 22 Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B (2011) How many species  
23 are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol* 9(8): e1001127.
- 24 Moya-Larano J, Foellmer M, Pekar S, Arnedo M, Bilde T, Lubin Y (2013)  
25 Evolutionary ecology: linking traits, selective pressures, and ecological factors.  
26 *In: Penney D, editor. Spider Research in the 21st Century: trends and*  
27 *perspectives. Manchester: Siri Scientific; 2013. pp. 112–153.*
- 28 Naseem S, Tahir HM (2018) Use of mitochondrial COI gene for the identification  
29 of family Salticidae and Lycosidae of spiders. *Mitochondrial DNA Part A* 29(1):96-  
30 101
- 31 Peters RH, Wassenberg K (1983) The effect of body size on animal  
32 abundance. *Oecologia* 60:89-96
- 33 Pie MR, Bornschein MR, Ribeiro LF, Faircloth BC, McCormack JE (2019)  
34 Phylogenomic species delimitation in microendemic frogs of the Brazilian Atlantic  
35 Forest. *Mol Phylogenet Evol* 141,106627
- 36 Planas E, Fernandez-Montraveta C, Ribera C (2013) Molecular systematics of  
37 the wolf spider genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae) in the Western  
38 Mediterranean Basin. *Mol Phylogenet Evol* 67(2):414-428

- 1 Polotow D, Carmichael A, Griswold CE (2015) Total evidence analysis of the  
2 phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae,  
3 Entelegynae). *Invertebr Syst* 29(2):124-163
- 4 Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S,  
5 Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP (2006) Sequence-based species delimitation  
6 for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst Biol* 55(4):595-609
- 7 Puillandre N, Brouillet S, Achaz G (2021) ASAP: assemble species by automatic  
8 partitioning. *Mol Ecol Res* 21(2):609-620
- 9 Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic  
10 Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21(8):1864-  
11 1877
- 12 Rambaut A (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of  
13 Edinburgh, Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- 14 Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior  
15 summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* syy032.  
16 doi:10.1093/sysbio/syy032
- 17 Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) Barcoding - Bold: The Barcode of Life Data  
18 System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol Ecol Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.  
19 01678.x
- 20 Robinson EA, Blagoev GA, Hebert PDN, Adamowicz SJ (2009) Prospects for  
21 using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *Zookeys* 16:27-  
22 46
- 23 Satler JD, Carstens BC, Hedin M (2013) Multilocus species delimitation in a  
24 complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae,  
25 Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Syst Biol* 62(6):805-823
- 26 Starrett J, Mcginley RH, Hebets EA, Bond JE (2022) Phylogeny, and secondary  
27 sexual trait evolution in *Schizocosa* wolf spiders (Araneae, Lycosidae) shows  
28 evidence for multiple gains and losses of ornamentation and species delimitation  
29 uncertainty. *Mol Phylogenet Evol* 169
- 30 Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018)  
31 Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10.  
32 *Virus Evol* 4(1)
- 33 Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics  
34 analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022-3027
- 35 Tanabe AS (2007) "Kakusan: a computer program to automate the selection of a  
36 nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on  
37 multilocus data", *Mol Ecol Notes* 7:962-964. doi: 10.1111/j.1471-  
38 8286.2007.01807. x.

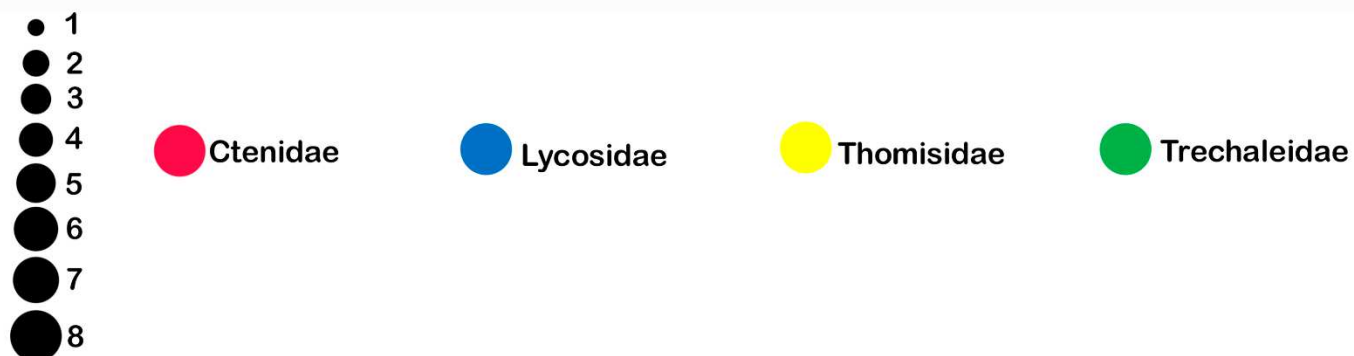
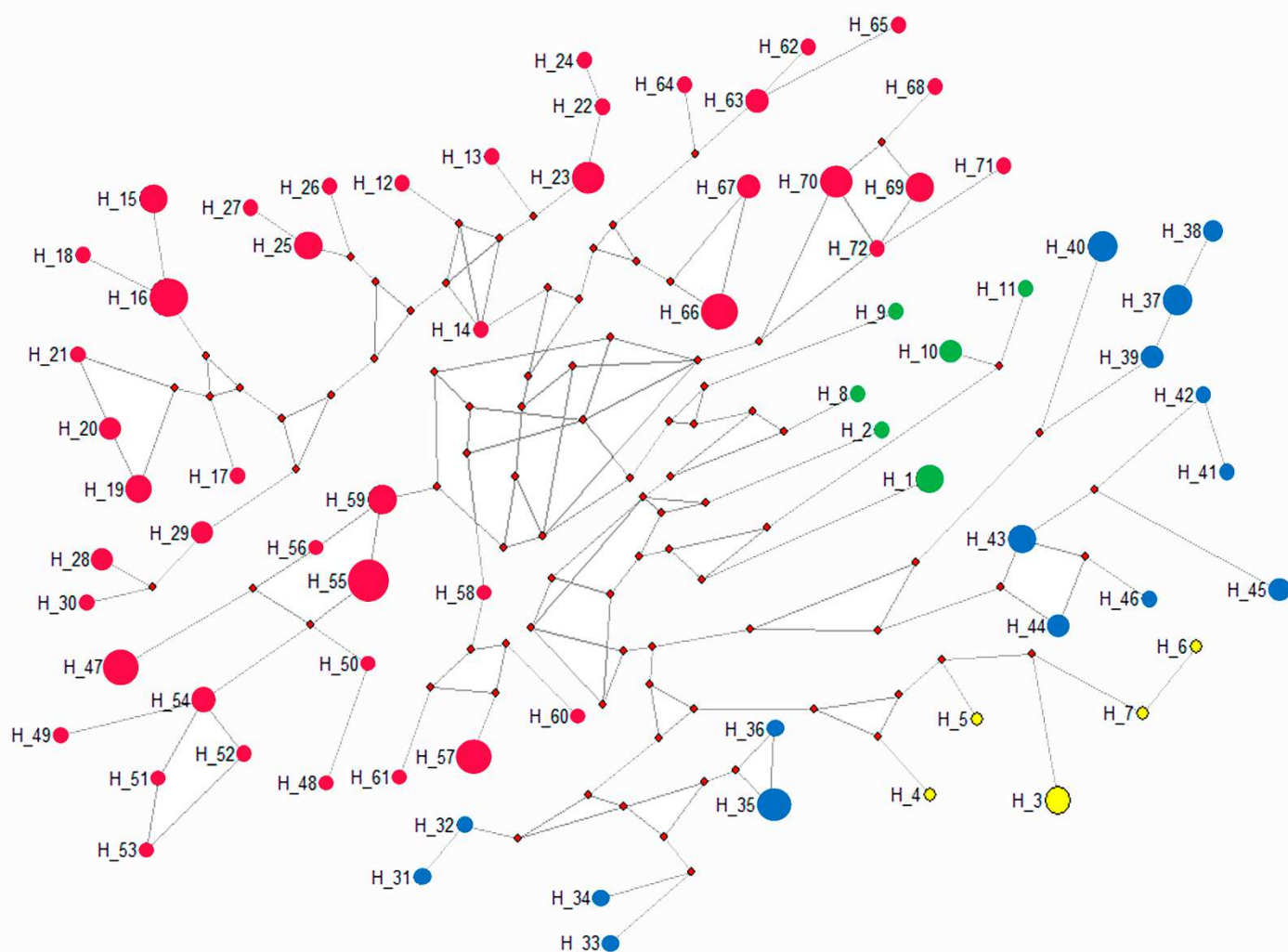
- 1 Togawa RC, Brigido MM (2003) PHPH: Web based tool for simple  
2 electropherogram quality analysis. 1st International Conference on  
3 Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003.  
4 Ribeirão Preto.
- 5 Tyagi K, Kumar V, Kundu S, Pakrashi A, Prasad P, Caleb JT, Chandra K (2019)  
6 Identification of Indian spiders through DNA barcoding: cryptic species and  
7 species complex. *Sci Rep* 9(1):1-13
- 8 Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA, Griswold  
9 CE, Hormiga G, Prendini L, Ramírez MJ, Sierwald P, Almeida-Silva L, Arnedo  
10 MA, Silva LRB, Benjamin SP, Bond JE, Grismado CJ, Hasan E, Hedin M,  
11 Izquierdo MA, Labarque FM, Ledford J, Lopardo L, Maddison WP, Miller JA,  
12 Piacentini LN, Platnick NI, Polotow D, Silva-Dávila D, Scharff N, Szuts T, Ubick  
13 D, Vink CJ, Wood HM, Zhang J (2016) The spider tree of life: phylogeny of  
14 Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon  
15 sampling. *Cladistics* 33(6):574-616
- 16 Wise DH (1993) *Spiders in ecological webs*. Cambridge: Cambridge University  
17 Press.
- 18 Wood HM, Griswold CE, Spicer GS (2007) Phylogenetic relationships within an  
19 endemic group of Malagasy 'assassin spiders' (Araneae, Archaeidae): ancestral  
20 character reconstruction, convergent evolution, and biogeography. *Mol*  
21 *Phylogenet Evol* 45(2):612-619
- 22 World Spider Catalog (2024) World Spider Catalog. Version 19.5. Natural History  
23 Museum Bern, 2024. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2
- 24 Xu X, Kuntner M, Bond JE, Ono H, Liu F, Yu L, Li D (2019) A multi-tier species  
25 delimitation approach resolves conflicts in delineating the primitively segmented  
26 spider genus *Heptathela* endemic to Japanese islands. *BioRxiv* 812214
- 27 Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A (2013) A general species delimitation  
28 method with applications to phylogenetic placements. *Bioinform* 29(22):2869-  
29 2876
- 30 Zhang Y, Li S (2014) A spider species complex revealed high cryptic diversity in  
31 South China caves. *Mol Phylogenet Evol* 79:353-358
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37

## 1 Material Suplementar

2

3 **Figura S1** – Rede de haplótipos composta pelos 140 indivíduos representando  
 4 as quatro famílias (Ctenidae - rosa, Lycosidae - azul, Thomisidae - amarelo e  
 5 Trechaleidae – verde), mostrando a distribuição dos 72 haplótipos. As variadas  
 6 métricas dos círculos representam a quantidade de indivíduos que possuem  
 7 aquele haplótipo (variando de 1 a 8 indivíduos – apoio a Tabela S1); os losangos  
 8 vermelhos indicam os haplótipos inferidos não amostrados neste trabalho.

9



1 **Tabela S1**– Lista das espécies e suas respectivas famílias mostrando a  
 2 distribuição dos haplótipos gerais do grupo total e suas localidades - Parque  
 3 Estadual do Guartelá (PEG) – Tibagi, Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG) – Londrina,  
 4 Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) – Ponta Grossa, Parque Municipal Arthur Thomas (PMAT)  
 5 – Londrina, Parque Nacional do Iguaçu (PNI) – Foz do Iguaçu, Parque Nacional de Ilha Grande  
 6 (PNIG) – Icaraíma, Parque Nacional de Superagui (PNS) – Guaraqueçaba, Parque Nacional  
 7 Saint-Hilaire-Lange (PNSH) – Matinhos, Reserva Biológica das Perobas (RBP) – Tuneiras do  
 8 Oeste e Reserva Fazenda Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (RFPS) - Santo Antônio da  
 9 Platina.

Ind.	Id. espécime	Família	Espécie	Localidade	Haplótipo
1	0429CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNS	Hap_47
2	0441CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNS	Hap_47
3	0458CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNS	Hap_47
4	0514CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNS	Hap_47
5	0547CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNS	Hap_47
6	0349CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_48
7	0348CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_49
8	0289CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_50
9	0160CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_51
10	0294CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_52
11	0300CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEMG	Hap_53
12	1380CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNI	Hap_54
13	1384CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNI	Hap_54
14	1299CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNI	Hap_55
15	1298CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNI	Hap_55
16	1293CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PNI	Hap_55
17	0816CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEVV	Hap_55
18	0779CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEVV	Hap_55
19	0772CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEVV	Hap_55
20	0872CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEVV	Hap_55
21	0840CO	Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	PEVV	Hap_56
22	0894CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PEVV	Hap_55
23	1101CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNSH	Hap_57
24	1118CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNSH	Hap_57
25	1061CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNSH	Hap_57
26	1100CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNSH	Hap_57
27	0180CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNS	Hap_57
28	1063CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNSH	Hap_58
29	0848CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PEVV	Hap_59

30	0784CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PEVV	Hap_59
31	0900CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PEVV	Hap_59
32	0993CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PEVV	Hap_59
33	0222CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNS	Hap_60
34	0437CM	Ctenidae	<i>Ctenus medius</i>	PNS	Hap_61
35	0534GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PNS	Hap_25
36	0535GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PNS	Hap_25
37	0537GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PNS	Hap_25
38	0539GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PNS	Hap_26
39	0548GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PNS	Hap_27
40	0806GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PEVV	Hap_28
41	0856GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PEVV	Hap_28
42	0810GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PEVV	Hap_29
43	0857GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PEVV	Hap_29
44	0902GL	Ctenidae	<i>Guasuctenus longipes</i>	PEVV	Hap_30
45	0337IO	Ctenidae	<i>Isoctenus ordinario</i>	PEMG	Hap_12
46	0342IO	Ctenidae	<i>Isoctenus ordinario</i>	PEMG	Hap_13
47	0346IO	Ctenidae	<i>Isoctenus ordinario</i>	PEMG	Hap_14
48	1122IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_15
49	0433IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_15
50	0512IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_15
51	1138IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_16
52	1139IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_16
53	1141IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_16
54	0453IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_16
55	0510IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_16
56	0511IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_16
57	0517IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNS	Hap_16
58	1136IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_17
59	1140IJ	Ctenidae	<i>Isoctenus janeirus</i>	PNSH	Hap_18
60	0456IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_19
61	0524IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_19
62	0526IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_19
63	0432IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_20
64	0524IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_20
65	0455IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PNS	Hap_21

66	0747IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_22
67	0749IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_23
68	0796IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_23
69	0862IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_23
70	0883IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_23
71	0860IC	Ctenidae	<i>Isoctenus coxalis</i>	PEVV	Hap_24
72	1000IS	Ctenidae	<i>Isoctenus strandi</i>	PNSH	Hap_62
73	1006IS	Ctenidae	<i>Isoctenus strandi</i>	PNSH	Hap_63
74	0999IS	Ctenidae	<i>Isoctenus strandi</i>	PNSH	Hap_63
75	1009IS	Ctenidae	<i>Isoctenus strandi</i>	PNSH	Hap_64
76	1017IS	Ctenidae	<i>Isoctenus strandi</i>	PNSH	Hap_65
77	0741IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
78	0738IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
79	0743IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
80	0822IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
81	0827IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
82	0915IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_66
83	0742IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_67
84	0833IH	Ctenidae	<i>Isoctenus herteli</i>	PEVV	Hap_67
85	1172PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_68
86	1173PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_69
87	1235PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_69
88	1239PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_69
89	1177PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_70
90	1181PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_70
91	1241PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_70
92	1242PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_70
93	1226PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_71
94	1237PB	Ctenidae	<i>Parabatinga brevipes</i>	PNIG	Hap_72
95	1531TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	RBP	Hap_37
96	1533TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	RBP	Hap_37
97	1534TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	RBP	Hap_37
98	1536TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	RBP	Hap_37
99	1595TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PEMG	Hap_38
100	0565TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PEMG	Hap_39
101	0566TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PEMG	Hap_39

102	0588TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PNI	Hap_40
103	0595TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PNI	Hap_40
104	0594TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PNI	Hap_40
105	0589TH	Lycosidae	<i>Trochosa</i> sp.	PNI	Hap_40
106	1212LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNIG	Hap_31
107	1213LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNIG	Hap_32
108	1214LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNIG	Hap_33
109	1215LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNIG	Hap_34
110	0233LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNS	Hap_35
111	0232LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNS	Hap_35
112	0502LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNS	Hap_35
113	0501LK	Lycosidae	<i>Lycosa nordenskjoldi</i>	PNS	Hap_36
114	0231LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PNS	Hap_41
115	0448LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PNS	Hap_42
116	0451LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PNS	Hap_43
117	0449LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PNS	Hap_43
118	0496LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PNS	Hap_43
119	0329LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PEMG	Hap_44
120	0080LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PEMG	Hap_44
121	0330LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PEMG	Hap_45
122	0081LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PEMG	Hap_45
123	0331LE	Lycosidae	<i>Lycosa erythrognatha</i>	PEMG	Hap_46
124	1831TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	RFPS	Hap_3
125	1833TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	RFPS	Hap_3
126	1834TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	RFPS	Hap_3
127	1859TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	PEG	Hap_3
128	1835TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	RFPS	Hap_4
129	1852TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	PEG	Hap_5
130	1858TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	PEG	Hap_6
131	1860TM	Thomisidae	<i>Tmarus</i> sp.	PEG	Hap_7
132	1275TB	Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i>	PNI	Hap_1
133	1356TB	Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i>	PNI	Hap_1
134	1354TB	Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i>	PNI	Hap_10
135	1355TB	Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i>	PNI	Hap_10
136	1365TB	Trechaleidae	<i>Trechaleoides biocellata</i>	PNI	Hap_11
137	1658TK	Trechaleidae	<i>Trechaleoides keyserlingi</i>	PMAT	Hap_1

138	1660TK	Trechaleidae	<i>Trechaleoides keyserlingi</i>	PMAT	Hap_2
139	1278TR	Trechaleidae	<i>Trechalea</i> sp.	PNI	Hap_8
140	1279TR	Trechaleidae	<i>Trechalea</i> sp.	PNI	Hap_9

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

- 1 **Tabela S2** - Distância interespecífica entre os grupos de espécies analisadas de  
 2 Ctenidae, Lycosidae, Thomisidae e Trechaleidae. Gp: grupo; GE: grupo externo.

<b>Espécies 1</b>	<b>Espécies 2</b>	<b>Distância interespecífica (d)</b>	<b>Desvio Padrão (SE)</b>
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	13,49%	1,68%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,21%	1,36%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	11,68%	1,47%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	12,40%	1,51%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,39%	1,88%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,81%	1,44%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	14,61%	1,83%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Trechalea</i> sp	14,03%	1,79%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	12,06%	1,68%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	14,24%	1,67%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	12,62%	1,72%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	6,41%	0,93%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	12,59%	1,70%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,47%	1,47%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	10,83%	1,48%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	12,36%	1,58%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,21%	1,88%
Gp <i>Ctenus ornatus</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,60%	1,55%
Gp GE	Gp <i>Tmarus</i> sp	11,14%	1,45%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	9,83%	1,49%
Gp GE	Gp <i>Trochosa</i> sp	12,89%	1,68%
Gp GE	Gp <i>Ctenus ornatus</i>	12,47%	1,73%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	11,16%	1,62%
Gp GE	Gp <i>Trechalea</i> sp	10,23%	1,43%
Gp GE	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,90%	2,01%
Gp GE	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	10,92%	1,44%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,87%	1,87%
Gp GE	Gp <i>Ctenus medius</i>	12,09%	1,60%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	14,57%	1,93%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,75%	1,61%
Gp GE	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	13,54%	1,81%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	14,33%	1,76%
Gp GE	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,25%	1,82%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,31%	1,59%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	11,95%	1,36%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,48%	1,88%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,85%	1,37%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,54%	1,88%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	8,25%	1,01%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	11,56%	1,49%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	10,63%	1,41%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,24%	1,77%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	9,64%	1,31%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,48%	1,75%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	10,91%	1,62%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	9,75%	1,50%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	11,27%	1,48%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	11,15%	1,44%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,59%	1,88%

Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,79%	1,52%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	9,85%	1,54%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	12,75%	1,62%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	13,29%	1,62%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,56%	1,95%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,12%	1,55%
Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	16,46%	1,88%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	15,28%	1,81%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	15,30%	1,68%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,80%	1,81%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	13,11%	1,67%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	15,54%	1,73%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	15,97%	1,74%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	8,90%	1,23%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,71%	1,72%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	16,35%	1,82%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,22%	1,83%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	12,10%	1,70%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,52%	1,98%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,40%	1,75%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	13,29%	1,68%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	14,49%	1,77%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,39%	1,97%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,04%	1,73%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	13,84%	1,70%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Trochosa</i> sp	13,30%	1,61%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Ctenus ornatus</i>	14,66%	1,82%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	14,89%	1,79%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Trechalea</i> sp	13,04%	1,53%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,70%	1,84%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	12,94%	1,54%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	14,17%	1,75%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Ctenus medius</i>	14,73%	1,75%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,71%	2,02%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,77%	1,64%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	13,34%	1,61%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	15,39%	1,74%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,10%	1,83%
Gp <i>Tmarus</i> sp	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,05%	1,71%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	16,18%	1,94%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	13,11%	1,51%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	14,79%	1,87%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,07%	1,59%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,81%	1,87%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,75%	1,59%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	14,91%	1,72%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	15,52%	1,77%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,23%	1,71%
Gp <i>Trechalea</i> sp	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,15%	1,72%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Trechalea</i> sp	12,07%	1,53%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,87%	1,86%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	13,36%	1,62%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,07%	1,70%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	14,49%	1,75%

Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,84%	1,96%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,09%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	14,46%	1,73%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	15,21%	1,70%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,61%	1,75%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,45%	1,73%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp	14,93%	1,85%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i>	14,13%	1,81%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	3,77%	0,65%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechalea</i> sp	11,51%	1,49%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,02%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	12,76%	1,60%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	12,61%	1,69%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,60%	1,70%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,74%	1,99%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	13,64%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	13,64%	1,65%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	14,60%	1,67%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,12%	1,74%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,50%	1,64%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Ctenus ornatus</i>	15,91%	1,95%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i>	15,34%	1,88%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Trechalea</i> sp	13,93%	1,66%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,64%	1,79%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i>	9,95%	1,27%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	15,99%	1,96%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Ctenus medius</i>	17,35%	1,99%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,68%	1,96%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,57%	1,81%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Guasuctenus longipes</i>	16,73%	1,93%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Isoctenus coxalis</i>	17,37%	1,90%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	9,33%	1,30%
Gp <i>Trochosa</i> sp	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	16,85%	1,84%

1

2 Nota: Os valores presentes representam a viabilidade de cada grupo de acordo com a divisão  
3 dos grupos por classificação morfológica, sendo os valores gerados pelo software MEGA 11  
4 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

- 1 **Tabela S3** - Distância interespecífica entre os grupos usando os novos conjuntos  
 2 de espécimes identificados na árvore de Neighbor-joining (NJ). Gp: grupo; GE:  
 3 grupo externo.

Espécies 1	Espécies 2	Distância interespecífica (d)	Desvio Padrão (SE)
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	13,95%	1,89%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,27%	1,53%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	12,32%	1,71%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	11,62%	1,64%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	16,40%	2,03%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	12,09%	1,71%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	9,96%	1,56%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	13,11%	1,78%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	14,99%	1,86%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,97%	2,00%
Gp <i>Ctenus medius</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,93%	1,66%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	14,92%	1,94%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	15,21%	1,92%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	14,49%	1,85%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	13,53%	1,79%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	12,03%	1,68%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	14,58%	1,84%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	14,54%	1,80%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,05%	1,77%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Ctenus medius</i>	9,11%	1,45%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	12,78%	1,79%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,29%	1,49%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	11,47%	1,63%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	11,65%	1,60%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	16,23%	1,96%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	10,43%	1,60%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	3,95%	0,86%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	13,39%	1,79%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	14,43%	1,81%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,31%	1,83%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,85%	1,70%
Gp GE	Gp <i>Tmarus</i> sp 1	10,83%	1,48%
Gp GE	Gp <i>Tmarus</i> sp 2	13,35%	1,74%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	9,34%	1,46%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	10,31%	1,55%
Gp GE	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	13,79%	1,86%
Gp GE	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	12,72%	1,77%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	11,06%	1,61%
Gp GE	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	12,07%	1,71%
Gp GE	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	8,37%	1,44%
Gp GE	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	12,08%	1,77%
Gp GE	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,90%	1,87%
Gp GE	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	11,81%	1,67%
Gp GE	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	10,82%	1,56%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,87%	1,88%
Gp GE	Gp <i>Ctenus medius</i>	11,91%	1,65%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	14,57%	1,90%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	10,75%	1,57%
Gp GE	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	13,84%	1,87%

Gp GE	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	12,99%	1,79%
Gp GE	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	11,31%	1,70%
Gp GE	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,24%	1,84%
Gp GE	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	11,30%	1,63%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	15,76%	2,05%
Gp GE	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	10,52%	1,55%
Gp GE	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,25%	1,82%
Gp GE	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,68%	1,70%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	12,17%	1,68%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	13,32%	1,72%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,01%	1,83%
Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,71%	1,76%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	11,84%	1,61%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	14,87%	1,94%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	7,04%	1,21%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	10,38%	1,60%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	11,21%	1,56%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	14,29%	1,91%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,20%	1,85%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	10,04%	1,52%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	10,23%	1,65%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	11,82%	1,66%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	15,50%	2,05%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,76%	2,11%
Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	12,56%	1,74%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	16,96%	2,01%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,08%	1,70%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	11,47%	1,65%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	10,16%	1,57%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	15,79%	2,03%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	17,17%	2,07%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	8,41%	1,32%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	15,42%	1,96%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,05%	1,99%
Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	10,40%	1,54%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	10,69%	1,57%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	10,87%	1,58%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	14,29%	1,89%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	12,42%	1,71%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	10,88%	1,58%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	10,51%	1,59%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	12,06%	1,70%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,24%	1,86%
Gp <i>Isoctenus herteli</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	8,63%	1,42%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,67%	1,91%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	10,91%	1,70%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	9,75%	1,53%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	9,68%	1,45%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	12,73%	1,78%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	14,34%	1,90%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	12,87%	1,71%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	11,36%	1,65%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	9,76%	1,46%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	14,07%	1,88%

Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,59%	1,89%
Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	10,71%	1,63%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	9,85%	1,58%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	11,55%	1,69%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	12,89%	1,78%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	16,21%	2,04%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,96%	1,86%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	11,96%	1,73%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	13,75%	1,85%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	15,48%	1,93%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	15,56%	1,95%
Gp <i>Isoctenus strandi</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	11,56%	1,72%
Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,69%	2,02%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	8,43%	1,36%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,81%	1,99%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	15,99%	2,03%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	16,77%	2,04%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,43%	1,93%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,04%	1,81%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	16,20%	2,05%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,97%	2,00%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	9,86%	1,52%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	16,17%	2,11%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,32%	1,74%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	17,81%	2,23%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	5,38%	1,05%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	9,48%	1,48%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	16,20%	2,02%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	7,95%	1,32%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	16,97%	2,14%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Ctenus medius</i>	16,36%	2,03%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,80%	2,04%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,30%	1,93%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	16,46%	2,04%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,94%	2,00%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	10,45%	1,60%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	15,89%	2,04%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,84%	1,80%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	16,04%	2,06%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	7,70%	1,34%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	9,26%	1,45%
Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,40%	2,01%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	15,91%	1,95%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	17,65%	2,09%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,22%	1,82%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	12,34%	1,80%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,52%	2,04%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,40%	1,68%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	12,76%	1,74%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	14,94%	1,87%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	13,67%	1,82%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,82%	1,82%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	11,83%	1,79%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	14,06%	1,85%

Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	15,92%	1,90%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	16,39%	1,89%
Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	13,53%	1,79%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Tmarus</i> sp 2	9,72%	1,38%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	12,72%	1,72%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	14,55%	1,84%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	13,03%	1,74%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	14,37%	1,87%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	14,49%	1,80%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	15,31%	1,88%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	12,31%	1,68%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	12,64%	1,72%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,06%	1,80%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	13,54%	1,78%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,54%	1,77%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,92%	1,82%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Ctenus medius</i>	14,00%	1,77%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,40%	2,04%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,51%	1,72%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	12,62%	1,71%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,00%	1,93%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	12,38%	1,69%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,30%	1,78%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,77%	1,81%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	15,27%	1,94%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	11,93%	1,64%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,70%	1,80%
Gp <i>Tmarus</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,27%	1,92%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	15,45%	1,96%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	15,14%	1,87%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	17,50%	2,13%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	18,29%	2,14%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	14,36%	1,79%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	15,68%	1,91%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	16,46%	1,99%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	17,55%	2,06%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	19,19%	2,26%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	14,64%	1,87%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	15,69%	1,90%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	15,92%	1,99%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	18,93%	2,16%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	18,87%	2,29%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,56%	1,92%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	16,00%	2,08%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	17,72%	2,16%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	15,67%	1,97%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	16,01%	1,97%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	16,19%	1,99%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	17,12%	2,11%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	13,53%	1,77%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	17,86%	2,08%
Gp <i>Tmarus</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	17,70%	2,21%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	7,97%	1,39%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	16,43%	1,98%

Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	13,58%	1,84%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,84%	1,83%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	15,43%	1,99%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,39%	1,74%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,46%	1,93%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	12,24%	1,64%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	15,93%	2,03%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,02%	1,98%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	13,32%	1,84%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	15,93%	2,05%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,33%	1,74%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	16,55%	2,05%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	11,99%	1,69%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,70%	1,92%
Gp <i>Trechalea</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,88%	1,94%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	15,93%	1,97%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	14,37%	1,92%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	14,65%	1,98%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	14,15%	1,91%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	11,89%	1,66%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,16%	2,10%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	13,27%	1,74%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	13,32%	1,83%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,07%	2,03%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	12,81%	1,82%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	14,46%	1,91%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	14,36%	1,89%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	15,49%	1,99%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	12,25%	1,78%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,77%	1,81%
Gp <i>Trechalea</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,29%	1,97%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	4,93%	1,04%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	12,33%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	12,83%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	15,87%	1,97%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	13,73%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,86%	1,86%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	12,87%	1,75%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Ctenus medius</i>	13,69%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,06%	2,03%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	13,77%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	13,94%	1,85%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,46%	1,96%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	13,84%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	14,54%	1,90%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,07%	1,81%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	14,72%	1,88%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	13,07%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	14,00%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,62%	1,89%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	12,07%	1,72%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	11,82%	1,67%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	15,01%	1,91%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	13,99%	1,87%

Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,60%	1,87%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	13,89%	1,89%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	15,16%	1,95%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,51%	2,02%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	15,07%	1,93%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	13,63%	1,87%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,41%	2,02%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	14,88%	2,00%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	15,59%	2,01%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	14,10%	1,92%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	15,51%	2,00%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	13,33%	1,81%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Lycosa erythrogna</i>	14,00%	1,84%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,53%	2,01%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	16,13%	2,09%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	14,45%	1,89%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	4,23%	0,93%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	2,86%	0,82%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	11,57%	1,73%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	12,33%	1,77%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	14,22%	1,87%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	13,21%	1,83%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,60%	1,87%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	12,35%	1,78%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Ctenus medius</i>	14,10%	1,85%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,05%	2,09%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	13,26%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	13,89%	1,88%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	15,14%	1,96%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	13,07%	1,88%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	14,95%	1,93%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	13,32%	1,84%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	15,24%	1,93%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	12,82%	1,79%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Lycosa erythrogna</i>	13,02%	1,76%
Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	14,88%	1,88%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 3	5,12%	1,06%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 2	16,14%	2,01%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	14,32%	1,85%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	5,36%	1,12%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	6,06%	1,21%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	11,31%	1,65%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	10,82%	1,65%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	13,82%	1,80%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	12,19%	1,70%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	13,36%	1,86%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	12,86%	1,77%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Ctenus medius</i>	12,41%	1,72%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	15,43%	2,06%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,03%	1,85%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	12,36%	1,79%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	13,62%	1,84%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	12,56%	1,75%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	13,34%	1,82%

Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	12,81%	1,81%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	14,71%	1,90%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	12,06%	1,75%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	13,22%	1,81%
Gp <i>Trechaleoides keyserlingi</i>	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	13,33%	1,76%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	16,67%	2,12%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	15,14%	1,90%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	17,09%	2,11%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	8,44%	1,46%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	7,96%	1,28%
Gp <i>Trochosa</i> sp 1	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	15,01%	1,92%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 1	16,25%	1,98%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 1	16,70%	2,06%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Trechaleoides biocellata</i> 2	15,86%	2,03%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 1	13,50%	1,78%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Trechalea</i> sp 2	15,36%	2,02%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Parabatinga brevipes</i>	15,20%	1,91%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 3	11,64%	1,66%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 2	9,61%	1,53%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus janeirus</i>	16,93%	2,10%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Ctenus medius</i>	18,89%	2,17%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus strandi</i>	16,94%	2,08%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus herteli</i>	14,74%	1,93%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 1	16,38%	2,00%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 1	17,35%	2,01%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Trochosa</i> sp 1	6,97%	1,24%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Guasuctenus longipes</i> 2	18,17%	2,20%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Ctenus ornatus</i> 2	14,80%	1,89%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus coxalis</i> 2	17,92%	2,14%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Lycosa nordenskjoldi</i> 1	10,03%	1,55%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Lycosa erythrognatha</i>	10,12%	1,49%
Gp <i>Trochosa</i> sp 2	Gp <i>Isoctenus ordinario</i>	17,19%	2,09%

1

2 Nota: Os valores presentes representam a viabilidade de cada grupo de acordo com a árvore de  
3 Neighbor-Joining (NJ) pelo modelo de Kimura 2 Parâmetros, gerados pelo software MEGA 11  
4 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021)

5

6

7

8

9

10



11

12

13

- 1 **Tabela S4** – Grupos formados pela divisão de ramos da árvore de Neighbor-  
 2 Joining (NJ) segundo as análises geradas no modelo de Kimura-2-Parâmetros  
 3 (KP2).

Família	Grupos (Gp)	Espécies	Indivíduos	Local	Símbolo
Ctenidae	Ctenus ornatus 1	<i>C. ornatus</i>	05	PEVV	1
		<i>C. ornatus</i>	05	PNI	2
		<i>C. ornatus</i>	06	PEMG	3
		<i>C. medius</i>	05	PEVV	1
	Ctenus ornatus 2	<i>C. ornatus</i>	05	PNS	4
	Ctenus medius	<i>C. medius</i>	05	PNS	4
		<i>C. medius</i>	05	PNSH	5
	Parabatinga brevipes	<i>P. brevipes</i>	10	PNIG	6
	Guasuctenus longipes 1	<i>G. longipes</i>	06	PNS	4
	Guasuctenus longipes 2	<i>G. longipes</i>	06	PEVV	1
	Isoctenus herteli	<i>I. herteli</i>	08	PEVV	1
	Isoctenus strandi	<i>I. strandi</i>	05	PNSH	5
	Isoctenus coxalis 1	<i>I. coxalis</i>	06	PEVV	1
		<i>I. ordinario</i>	01	PEMG	3
	Isoctenus ordinario	<i>I. ordinario</i>	02	PEMG	3
	Isoctenus coxalis 2	<i>I. coxalis</i>	06	PNS	4
Isoctenus janeirus	<i>I. janeirus</i>	06	PNS	4	
	<i>I. janeirus</i>	06	PNSH	5	
Thomisidae	Tmarus sp1	<i>Tmarus</i> sp	03	RFPS	7
		<i>Tmarus</i> sp	04	PEG	8
	Tmarus sp2	<i>Tmarus</i> sp	01	RFPS	7

Lycosidae	Lycosa nordenskjoldi 1	<i>L. nordenskjoldi</i>	04	PNS	4
	Lycosa nordenskjoldi 2	<i>L. nordenskjoldi</i>	02	PNIG	6
	Lycosa nordenskjoldi 3	<i>L. nordenskjoldi</i>	02	PNIG	6
	Lycosa erythrognatha	<i>L. erythrognatha</i>	05	PEMG	3
		<i>L. erythrognatha</i>	05	PNS	4
	Trochosa sp1	<i>Trochosa sp</i>	04	PNI	2
	Trochosa sp2	<i>Trochosa sp</i>	02	PEMG	3
<i>Trochosa sp</i>		05	RBP	9	
Trechaleidae	Trechalea sp1	<i>Trechalea sp</i>	01	PNI	2
	Trechalea sp2	<i>Trechalea sp</i>	01	PNI	2
	Trechaleoides keyserlingi	<i>T. keyserlingi</i>	01	PMAT	
	Trechaleoides biocellata 1	<i>T. biocellata</i>	01	PNI	2
	Trechaleoides biocellata 2	<i>T. biocellata</i>	02	PNI	2
	Trechaleoides biocellata 3	<i>T. biocellata</i>	02	PNI	2
		<i>T. keyserlingi</i>	01	PMAT	

1 Nota: a tabela segue a ordem da distribuição dos ramos da árvore NJ

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

## Capítulo 2

### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LOC*/ MICROSSATÉLITES EM *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877) (LYCOSOIDEA: CTENIDAE)

Este artigo será submetido a Revista Genetics and Molecular Biology

1 Isolamento e Caracterização de *Loci* Microssatélites em *Ctenus ornatus* (Keyserling,  
2 1877) (Lycosoidea: Ctenidae)

3  
4 Analiza Fernanda Cavenagh<sup>1</sup>, Camila Satie Savada<sup>1</sup>, Rogério Fernandes de Souza<sup>2</sup>,  
5 Thayná Bisson Ferraz Lopes<sup>3</sup>, Matheus Pires Rincão<sup>4</sup>, Antonio Domingos  
6 Brescovit<sup>5</sup>, Fernanda Simões de Almeida<sup>1</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-  
9 Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná  
10 – Brasil

11 <sup>2</sup>Laboratório de Bioinformática (LB), Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-Graduação em  
12 Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná - Brasil

13 <sup>3</sup>Laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular (LACEM) – Programa de Pós-Graduação em  
14 Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná - Brasil

15 <sup>4</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Centro de Ciências Biológicas - Campus Luiz  
16 Meneghel, Bandeirantes, Paraná - Brasil

17 <sup>5</sup>Laboratório de Coleções Zoológicas – Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP - Brasil

## 18 **Resumo**

19 Os marcadores microssatélites são utilizados para aplicações em estudos  
20 genéticos populacionais, e o NGS tem possibilitado o acesso a novos  
21 marcadores com maior eficiência e menor custo. Assim, o presente estudo teve  
22 como objetivo o desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Ctenus*  
23 *ornatus* e seu uso em análises de transferabilidade, utilizando do genoma total  
24 desse espécime. Oito *loci* microssatélites foram desenvolvidos e descritos para  
25 *C. ornatus*. Sete deles polimórficos, testados em 34 indivíduos onde observou-  
26 se 2-5 alelos por loco. Os valores de heterozigosidade observada foram de até  
27 0,665. Nove espécies de Ctenidae e Lycosidae também foram testadas para  
28 amplificação dos loci, dentre as quais, *C. medius* foi a mais bem sucedida na  
29 transferência de *primers*. O desenvolvimento de marcadores microssatélites  
30 vem contribuir para estudos populacionais desta e de espécies correlacionadas.

31  
32  
33  
34  
35 **Palavras-chave:** Ctenidae; NGS; SSR; Transferabilidade

36

37

38

39

## 1 **Introdução**

2 Os sequenciamentos de alto rendimento vem proporcionando uma  
3 viabilidade econômica nos estudos para análises populacionais e de ecologia  
4 molecular (Krehenwinkel et al., 2019), com o importante avanço possibilitado  
5 pela tecnologia atual, a geração de dados sequenciais promove a obtenção de  
6 milhares de marcadores que podem ser isolados de organismos “não modelos”  
7 (Ekblom e Galindo 2011; Ellegren, 2014). A demanda produtiva desses  
8 marcadores resultantes colaborou muito para uma compreensão dos processos  
9 evolutivos e ecológicos, inclusive no campo da aracnologia (Brewer et al., 2014).

10 Os microssatélites são multialélicos, sequências curtas repetidas de  
11 DNA, e que evoluem rapidamente, portanto, marcadores úteis para analisar  
12 taxas de acasalamento, genética populacional e de conservação, bem como  
13 observar divergência evolutiva recente (Schäfer et al., 2008; Tuni et al., 2012;  
14 Krehenwinkel e Tautz, 2013; Zimmer et al., 2014; Krehenwinkel et al., 2016).

15 O uso de microssatélites (SSR) demanda o isolamento e  
16 desenvolvimento de *primers* específicos da espécie e/ou a disponibilidade de  
17 *primers* de espécies próximas para testes de transferabilidade (Zanella et al.,  
18 2017). A aplicação de microssatélites no grupo das aranhas não é inexistente,  
19 mas seu crescimento ainda caminha vagarosamente (Parmakelis et al., 2013;  
20 Brewer et al., 2014).

21 Como elucidado no trabalho de Hamilton e colaboradores (2014), as  
22 espécies são fonte de dados importantes em qualquer investigação biológica,  
23 estimulando pesquisas na abrangência de padrões biogeográficos, conservação  
24 e manejo, teorias da evolução e processos biológicos.

25 Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi desenvolver um conjunto  
26 de marcadores microssatélites polimórficos para a espécie *Ctenus ornatus*  
27 (Keyserling, 1877), um aracnídeo associado diretamente a um ambiente de mata  
28 preservada, sendo um bioindicador de qualidade ambiental, já que são exigentes  
29 quanto as condições do habitat e mais vulneráveis a alterações na estrutura da  
30 vegetação (Rego et al., 2005; Mestre e Gasnier, 2008). O desenvolvimento de  
31 marcadores microssatélites espécie-específico contribuirá para a exploração da  
32 diversidade genética de populações naturais de *Ctenus ornatus*.

## 1 **Material e Métodos**

### 2 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

3 O DNA genômico foi extraído do tecido muscular da perna de um  
4 espécime de *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877), a partir do protocolo com fenol-  
5 clorofórmio de Almeida et al (2001). Em gel de agarose, foi verificada a  
6 integridade e a concentração do DNA obtida no quantificador fluorométrico  
7 Qubit®. A amostra foi encaminhada para o sequenciamento de nova geração em  
8 sequenciador de plataforma Illumina NovaSeq (*paired-end* 2x150pb) executado  
9 pela empresa GenOne Biotech (<https://www.genone.com.br/>).

### 10 MONTAGEM DO GENOMA DE *Ctenus ornatus*

11 A qualidade dos *reads* obtidos no sequenciamento foi analisada utilizando  
12 o *software* FastQC (Andrews, 2010). *Reads* que apresentaram baixa qualidade  
13 foram removidos pelo *software* TrimGalore v0.6.7 (Krueger et al., 2015). O valor  
14 mínimo de qualidade utilizado foi o de phred 33 para as duas bibliotecas. Os  
15 *reads* com qualidade superior originados do sequenciamento do indivíduo foram  
16 utilizados na montagem das sequências do genoma de *Ctenus ornatus* utilizando  
17 o *software* ABySS v4.3 (Simpson et al., 2009). A identificação das regiões  
18 microssatélites, retroelementos, DNA transposons entre outras, foi feita  
19 utilizando o *software* RepeatMasker (Tarailo-Graovac e Chen, 2009).

### 20 SELEÇÃO E DESENHO DOS *PRIMERS*

21 Os dados foram analisados no RepeatExplorer2 (Novák et al., 2013), os  
22 arquivos *contigs* (fasta) por ele gerados em cada simulação (rápida, longa e  
23 extralonga de montagens) foram submetidos ao MISA-web (Beier et al., 2017)  
24 (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) que fez a predição de  
25 microssatélites.

26 A seleção destes e a montagem dos *primers* foram feitas nos programas  
27 *Primer 3* (Rozen e Skaletsky, 2000) e *AutoDimer* v1.0 (Vallone e Butler, 2004)  
28 (<https://strbase.nist.gov//AutoDimerHomepage>). Os *primers forward* de cada  
29 loco foram confeccionados com uma sequência adicional M13 (5'-  
30 TGAAAACGACGGCCAGT-3'), na extremidade terminal 5' (Schuelke, 2000),  
31 permitindo a marcação na PCR com fluorescências.

1 A verificação da qualidade dos *loci* de microssatélites foi realizada em 34  
2 espécimes de *Ctenus ornatus* coletados no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta  
3 Grossa – Paraná (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O).

#### 4 TESTES DE TRANSFERABILIDADE

5 A transferabilidade foi testada com amplificação cruzada em cinco  
6 espécimes de oito espécies da família Ctenidae e uma espécie da família  
7 Lycosidae. As espécies testadas foram: *Ctenus medius* Keyserling, 1891;  
8 *Guasuctenus longipes* (Keyserling, 1891); *Isoctenus coxalis* (FO Pickard-  
9 Cambridge, 1902); *I. janeirus* (Walckenaer, 1837); *I. herteli* (Mello-Leitão, 1947);  
10 *I. strandi* Mello-Leitão, 1936; *I. ordinario* Polotow & Brescovit, 2009; *Parabatinga*  
11 *brevipes* (Keyserling, 1891) e *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836.

#### 12 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

13 O DNA de todos os espécimes foi obtido pelo mesmo protocolo de  
14 extração já citado, e em gel de agarose, foi verificada a integridade e quantidade  
15 do DNA obtido para posterior diluição. As reações de PCR foram realizadas em  
16 um volume total de 10  $\mu$ L, contendo 4,5 $\mu$ L GoTaq® Green Master Mix  
17 (Promega), 0,2 $\mu$ L glicerol, 0,25 $\mu$ L *primer* mix, 0,25 $\mu$ L de iniciador M13 com  
18 fluorescência (FAM, HEX, NED e PET; Applied Biosystems), e 2 $\mu$ L de amostra  
19 de DNA. A amplificação foi realizada com a desnaturação inicial a 94°C por 5  
20 min, seguida de 10 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min,  
21 seguido por 25 ciclos de 89°C por 30 s, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, e com  
22 extensão final de 72°C por 30 min. Os produtos de PCR foram genotipados em  
23 sequenciador automático ABI3500 xL (Applied Biosystems) usando o marcador  
24 de peso molecular GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems).

25 O tamanho dos alelos foi determinado manualmente usando o programa  
26 GeneMarker v.2.2.0 (SoftGenetics). No Micro Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout  
27 et al., 2004) alelos nulos, desistências de alelos e erros de anotação foram  
28 verificados. O número de alelos por *locus* ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ )  
29 e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foram obtidos em GenAlEx v.6.5 (Peakall e  
30 Smouse, 2006). O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi calculado no Arlequin  
31 programa v.3.5.2.2 (Excoffier e Lischer, 2010). A estimativa de equilíbrio de  
32 Hardy Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação, com as correções de

1 Bonferroni, foram realizadas no GENEPOP v.1.2 (Raymond e Rousset, 1995;  
2 Rousset, 2008).

### 3 **Resultados e Discussão**

#### 4 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *CTENUS ORNATUS*

5 A partir das bibliotecas de *Ctenus ornatus*, o sequenciamento resultou em  
6 49.094.216 *reads paired-end* depois da análise de qualidade das sequências.  
7 *Reads* de baixa qualidade comprometem o processo de análise do genoma, pois,  
8 a contaminação das sequências diminui a confiabilidade das análises (Del  
9 Fabbro et al., 2013; Ekblom e Wolf, 2014), contudo as sequências quase não  
10 precisaram de limpeza.

11 Na montagem desse genoma foi obtido um total de 1.380.567.951 pares  
12 de bases (pb) que corresponde aos 10.69e6 pb de *scaffolds* os quais tiveram  
13 variação de 500 a 105.807 pb em tamanho. Os resultados obtidos no  
14 sequenciamento, representam uma aplicação positiva quanto a geração de  
15 dados levando em consideração a limitação de informações genômicas  
16 disponíveis nos grupos das aranhas.

17 Os nucleotídeos A e T representaram 65,68% do total de bases  
18 sequenciadas (**Tabela 1**) e o conteúdo GC do genoma de *C. ornatus*  
19 sequenciado foi de 34,32%. Essa proporção encontrada no conteúdo de bases  
20 se assemelha ao valor caracterizado em trabalho anterior (**Capítulo 1**), o que  
21 fica bem próximo ao relatado para aranhas (Astrin et al., 2006; Ayoub et al., 2005;  
22 Wood et al., 2007; Astrin et al., 2016).

23 **Tabela 1.** Parâmetros da montagem do genoma de *Ctenus ornatus*.

Parâmetros	Valores
Número total de <i>scaffolds</i>	11.99e6
Tamanho total dos <i>scaffolds</i> (pb)	10.69e6
Tamanho do maior <i>scaffolds</i> (pb)	105.807
Tamanho do menor <i>scaffolds</i> (pb)	500
N50 dos <i>scaffolds</i>	579
<i>Scaffolds</i> AT%	65,68
<i>Scaffolds</i> GC%	34,32

1 Em relação aos diferentes grupos de elementos repetitivos foram  
2 identificados pelo *RepeatMasker* no genoma de *C. ornatus* um total de  
3 14.518.374 pares de base. Os microssatélites representaram o maior número de  
4 sequências repetitivas encontradas (295.677 elementos) correspondentes a  
5 11.605.311 pares de bases.

#### 6 SELEÇÃO DOS PRIMERS E ANÁLISE POPULACIONAL

7 Foram examinadas no RepeatExplorer2 (Novák et al., 2013), os arquivos  
8 *contigs* (fasta) por ele gerado em cada simulação (rápida, longa e extralonga de  
9 montagens) que submetidos ao MISA-web (Beier et al., 2017) que faz a predição  
10 de microssatélites, um total de 6.352 sequências, com tamanho total de  
11 1.786.206 pb. Onde foram identificados 1.149 SSRs, sendo eles: 710 mono-  
12 nucleotídeo; 389 di-nucleotídeo; 11 tri-nucleotídeo; 38 tetra-nucleotídeo e 1  
13 penta-nucleotídeo.

14 Após avaliados no *Primer 3* foram selecionadas 168 combinações para  
15 aplicação no AutoDimer, 46 tiveram sucesso e após a inserção da cauda M13  
16 novamente testados, dezoito foram escolhidos de acordo com a qualidade da  
17 sequência e análise dos *primers* nos primeiros testes. Desses escolhidos, após  
18 serem testados em diferentes condições de amplificação, oito *loci* conseguiram  
19 amplificar a população de *C. ornatus*, sendo a maioria polimórfica, exceto o *locus*  
20 Cteo11.

21 Para os oito *loci* microssatélites, foram identificados um total de 23 alelos  
22 (número médio de alelos de 2,87 por loco), variando de um alelo (Cteo11) a cinco  
23 alelos (Cteo01 e Cteo12). Os menores valores de heterozigosidade observada e  
24 esperada foram obtidos para os *loci* Cteo10 e Cteo12 ( $H_o = 0,000$  e  $H_e = 0,180$ )  
25 respectivamente, e os maiores valores de heterozigosidade observada e  
26 esperada foram obtidos para o loco Cteo01 ( $H_o = 1,000$  e  $H_e = 0,665$ ) (**Tabela**  
27 **2**). O  $F_{is}$  não apresentou valor significativo ( $p \leq 0,05$ ) para nenhum dos *loci*; e  
28 considerando as correções de Bonferroni, o valor de HWE foi significativo para  
29 os *loci* Cteo01, Cteo10, Cteo14 e Cteo15 (**Tabela 2**) enquanto para o  
30 desequilíbrio de ligação nenhuma das combinações teve valor significativo.

31 Dos oito *loci* microssatélites descritos neste trabalho para *Ctenus ornatus*,  
32 sete foram polimórficos, indicando sua utilização em estudos genéticos

1 relacionados a espécie. Os *loci* Cteo01, Cteo10, Cteo14 e Cteo15 mostraram  
2 valores significativos para HWE podendo indicar uma possível endogamia; as  
3 análises do Micro Checker indicaram excesso de homozigotos no loco Cteo10;  
4 contudo, os valores de  $F_{IS}$  não apresentaram valores significativos ( $p \leq 0,05$ ) e a  
5  $H_0$  foi dos menores valores.

**Tabela 2** – Descrição de oito *primers* para *loci* microssatélites isolados de *Ctenus ornatus*.

Nome do loco	Repetição de sequência	Sequências de <i>primers</i> (5' - 3')	T (°C)	N	Tam. do alelo (pb)	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE
Cteo01	(AT) <sub>9</sub>	F: GCTTAGGGACAGACAGGCAT R: CATTTC AATGCTTACCGGGG	56	27	195-219	5	1,000	0,665	-0,490	0*
Cteo02	(AT) <sub>9</sub>	F: GCGAAAATGCGGACAAATGA R: GGAGTAGCCCTTCATAGCCC	56	34	216-220	2	0,471	0,360	-0,294	0,148
Cteo05	(AT) <sub>12</sub>	F: CGACAGAGCCAGAACAAGG R: GGTCTCCTAGATCTCTGTACAAC	56	30	158-180	3	0,300	0,331	0,110	0,307
Cteo10	(TA) <sub>8</sub>	F: GCGTGAGAGATAGACTGCCT R: GCTAGGGGCGGTTTTGTC	56	23	258-274	2	0,000	0,340	1,000	0*
Cteo11	(AG) <sub>11</sub>	F: AGAGGGATGAGATGAGCTTTGT R: ACTCTGCACCCACACTATTG	63	36	119	1	0,000	0,000	-	-
Cteo12	(CT) <sub>12</sub>	F: TCTCTGCACCCACACTATTG R: AGAGGGATGAGATGAGCTTTGT	56	26	247-275	5	0,192	0,180	-0,046	1
Cteo14	(AAT) <sub>9</sub>	F: AGAGCGCTGAGGAAATTTGA R: AGAGTGAAAGTGAATCGAGACAG	56	34	241-244	2	0,971	0,500	-0,941	0*
Cteo15	(TG) <sub>8</sub>	F: GCACTTTCGAGCCTCCATTT R: TGCAATTTGGAGTAGAGGCATG	56	34	158-170	3	1,000	0,590	-0,687	0*

Abreviaturas: A, número de alelos; F<sub>IS</sub>, coeficiente de endogamia; H<sub>e</sub>, Heterozigosidade esperada; H<sub>o</sub>, Heterozigosidade observada; N, número de indivíduos; T(°C), temperatura de pareamento; HWE, Equilíbrio de Hardy-Weinberg. \*valores significativos

## 1    TESTE DE TRANSFERABILIDADE

2            Para a espécie do mesmo gênero, *C. medius*, obteve-se sucesso com quatro  
3 *loci* polimórficos (Cteo01, Cteo02, Cteo05 e Cteo12). Enquanto para as outras  
4 espécies analisadas de Ctenidae e Lycosidae obteve sucesso com apenas um loco  
5 (Cteo05) (**Tabela 3**).

6            Considerando as oito espécies que foram usadas da família e a espécie de  
7 Lycosidae, *Ctenus medius* foi a que obteve maior sucesso na amplificação, com cinco  
8 dos oito *loci*, o fato de estarem incluídas no mesmo gênero estreita a relação  
9 filogenética, ou seja, a baixa distância entre as espécies, dados estes já observado  
10 em trabalho anterior ( $3,95\pm 0,86\%$ , dados Capítulo 1). Segundo Barbará et al. (2007),  
11 quanto maior for a relação filogenética entre duas espécies maiores as chances de  
12 sucesso na transferabilidade de *loci* microssatélites.

13            O loco Cteo05 foi polimórfico para a espécie principal do estudo e obteve  
14 sucesso em todas as espécies analisadas da mesma família e de Lycosidae, contudo  
15 se apresentou monomórfico nas espécies de *P. brevipes* e *L. erythrogatha*. Mesmo  
16 conhecendo as características de cada microssatélite não se pode prever com  
17 segurança se haverá maior ou menor probabilidade de apresentar polimorfismo.  
18 Assim, também é coerente persistir no teste de padronização dos locus de  
19 microssatélites na busca de polimorfismo, principalmente quando se está usando  
20 *primers* heterólogos (Gurgel, 2009).

21

22

23

24

25

26

27

**Tabela 3** – Amplificação cruzada dos oito *primers* microsatélites em oito espécies da família Ctenidae e uma da família Lycosidae

Espécies	<i>Locus</i> microsatélites							
	<b>Cteo01</b>	<b>Cteo02</b>	<b>Cteo05</b>	<b>Cteo10</b>	<b>Cteo11</b>	<b>Cteo12</b>	<b>Cteo14</b>	<b>Cteo15</b>
<i>Ctenus medius</i>	201-219(2) <sup>4</sup>	215-223(2) <sup>5</sup>	156-202(5) <sup>5</sup>	-	119(1) <sup>5</sup>	243-251(3) <sup>4</sup>	-	-
<i>Guasuctenus longipes</i>	-	-	182-194(3) <sup>4</sup>	-	119(1) <sup>4</sup>	-	-	-
<i>Isoctenus coxalis</i>	-	-	158-184(3) <sup>3</sup>	-	119(1) <sup>5</sup>	-	-	-
<i>Isoctenus janeirus</i>	-	-	134-192(2) <sup>5</sup>	-	119(1) <sup>4</sup>	-	-	-
<i>Isoctenus herteli</i>	-	-	188-192(2) <sup>4</sup>	-	119(1) <sup>4</sup>	-	-	-
<i>Isoctenus strandi</i>	-	-	160-192(4) <sup>3</sup>	-	119(1) <sup>5</sup>	-	-	-
<i>Isoctenus ordinario</i>	-	-	106-206(4) <sup>4</sup>	-	119(1) <sup>2</sup>	-	-	-
<i>Parabatinga brevipes</i>	-	-	185(1) <sup>4</sup>	-	119(1) <sup>5</sup>	-	-	-
<i>Lycosa erythrognatha</i>	-	-	160(1) <sup>1</sup>	-	119(1) <sup>4</sup>	-	-	-

Nota: Os números entre parênteses indicam o número de alelos encontrados. Os números sobrescritos representam o número de indivíduos que tiveram sucesso na amplificação. Foram usados cinco indivíduos de cada espécie.

## 1 **Conclusão**

2 A partir do uso do sequenciamento de nova geração com baixa cobertura  
3 foi possível proporcionar a produção de dados genômicos inéditos para a  
4 espécie *Ctenus ornatus*. Foi possível selecionar neste estudo regiões para o  
5 desenvolvimento de marcadores, disponibilizando sete pares de *primers*  
6 padronizados que apresentaram polimorfismo e podem ser utilizados em  
7 estudos genéticos-populacionais dessa espécie de aranha. Além de ser o  
8 primeiro trabalho que descreve e padroniza marcadores microssatélites para  
9 *Ctenus ornatus*, torna-se um estudo de grande importância para possível  
10 avaliação genética de populações da espécie e em análises de espécies  
11 próximas usando a transferabilidade, possibilitando a utilização em futuros  
12 estudos genéticos e conseqüentemente a conservação do grupo.

## 13 **Referências**

- 14 Almeida FS, Fungaro MHP, Sodré LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of  
15 genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae)  
16 from the Tibagi River, Brazil. J Zool 253(1):113-120
- 17 Astrin JJ, H fer H, Spelda J, Holstein J, Bayer S, Hendrich L, Huber BA, Kielhorn  
18 KH, Krammer HJ, Lemke M, Monje JC, Morini re J, Rulik B, Petersen M, Janssen  
19 H, Muster C (2016) Towards a DNA barcode reference database for spiders and  
20 harvestmen of Germany. PloS one 11(9): e0162624.
- 21 Astrin JJ, Huber BA, Misof B, Kluetsch CF (2006) Molecular taxonomy in pholcid  
22 spiders (Pholcidae, Araneae): evaluation of species identification methods using  
23 CO1 and 16S rRNA. Zool Scrip 35(5):441-457
- 24 Ayoub NA, Riechert SE, Small RL (2005) Speciation history of the North  
25 American funnel web spiders, *Agelenopsis* (Araneae: Agelenidae): Phylogenetic  
26 inferences at the population–species interface. Mol Phylogenet Evol 36(1):42-57
- 27 Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-  
28 species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Mol  
29 Ecol 16(18):3759-3767.
- 30 Beier S, Thiel T, M nch T, Scholz U, Mascher M (2017) MISA-web: a web server  
31 for microsatellite prediction. Bioinform 33:2583–2585.  
32 dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198
- 33 Brewer MS, Cotoras DD, Croucher PJ, Gillespie RG (2014) New sequencing  
34 technologies, the development of genomics tools, and their applications in  
35 evolutionary arachnology. J Arachnol 42:1-15

- 1 Del Fabbro C, Scalabrin S, Morgante M, Giorgi FM (2013) An extensive  
2 evaluation of read trimming effects on Illumina NGS data analysis. PloS one  
3 8(12): e85024
- 4 Ellegren H (2014) Genome sequencing and population genomics in non-model  
5 organisms. Trends Ecol Evol 29:51-63
- 6 Ekblom R, Galindo J (2011) Applications of next generation sequencing in  
7 molecular ecology of non-model organisms. Heredity 107:1-15
- 8 Ekblom R, Wolf JBW (2014) A field guide to whole-genome sequencing,  
9 assembly and annotation, Evol App 7(9):1026-1042
- 10 Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs  
11 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Res  
12 10:564-567
- 13 Gurgel ZER (2009) Aplicabilidade de marcadores microssatélites na análise de  
14 resposta de populações de *Tetragonisca angustula* (Apoidea, Hymenoptera) à  
15 heterogeneidade de habitats na costa Atlântica. 2009. 69p. Dissertação (Mestre  
16 em Ecologia e Biomonitoramento) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 17 Hamilton CA, Hendrixson BE, Brewer MS, Bond JE (2014) An evaluation of  
18 sampling effects on multiple DNA barcoding methods leads to an integrative  
19 approach for delimiting species: a case study of the North American tarantula  
20 genus *Aphonopelma* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). Mol  
21 Phylogenet Evol 71:79-93
- 22 Krehenwinkel H, Meese S, Mayer C, Ruch J, Schneider J, Bilde T, Künzel S,  
23 Henderson, JB, Russack J, Simison WB, Gillespie R, Uhl G (2019) Cost effective  
24 microsatellite isolation and genotyping by high throughput sequencing. J  
25 Arachnol 47:190-201
- 26 Krehenwinkel H, Tautz D (2013) Northern range expansion of European  
27 populations of the wasp spider *Argiope bruennichi* is associated with global  
28 warming-correlated genetic admixture and population-specific temperature  
29 adaptations. Mol Ecol 22:2232-2248
- 30 Krehenwinkel H, Rödder D, Năpăruș-Aljančić M, Kuntner M (2016) Rapid genetic  
31 and ecological differentiation during the northern range expansion of the  
32 venomous yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* in Europe. Evol App  
33 9:1229-1240
- 34 Krueger F (2015) Trim Galore!: A wrapper around Cutadapt and FastQC to  
35 consistently apply adapter and quality trimming to FastQ files, with extra  
36 functionality for RRBS data. Babraham Institute.  
37
- 38 Mestre LAM, Gasnier TR (2008) Populations of *Ctenus* wandering spiders in  
39 Amazonian Forest fragments. Acta Amazon 38:159-164

- 1 Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a  
2 Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic  
3 repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinform* 29(6):792-  
4 793
- 5 Parmakelis A, Balanika K, Terzopoulou S, Rigal F, Beasley RR, Jones KL, Lance  
6 SL, Whittaker RJ, Triantis KA, Borges P V (2013) Development of 28 polymorphic  
7 microsatellite markers for the endemic Azorean spider *Sancus acoreensis*  
8 (Araneae, Tetragnathidae). *Conserv Genet Resour* 5:1133-1134
- 9 Peakall ROD, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel.  
10 Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1):288-  
11 295
- 12 Rego FN, Venticinque EM, Brescovit AD (2005) Densidades de aranhas errantes  
13 (Ctenidae e Sparassidae, Araneae) em uma floresta fragmentada. *Biota Neotrop*  
14 5(1A):45-52
- 15 Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop  
16 software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8:103-106
- 17 Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for  
18 biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in*  
19 *Molecular Biology* (Krawetz, S. & Misener, S., ed.), Totowa, NJ: Humana Press,  
20 pp.365-386.
- 21 Schäfer MA, Misof B, Uhl G (2008) Effects of body size of both sexes and female  
22 mating history on male behaviour and paternity success in a spider. *Anim Behav*  
23 76:75-86
- 24 Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR  
25 fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234
- 26 Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJ, Birol I (2009) ABySS:  
27 a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res* Jun;19(6):1117-  
28 23. doi: 10.1101/gr.089532.108.
- 29 Tarailo-Graovac M, Chen N (2009) Using RepeatMasker to identify repetitive  
30 elements in genomic sequences. *Curr Protoc Bioinformatics*, p.4.10. 1-4.10.
- 31 Tuni C, Goodacre S, Bechsgaard J, Bilde T (2012) Moderate multiple parentage  
32 and low genetic variation reduces the potential for genetic incompatibility  
33 avoidance despite high risk of inbreeding. *PLOSOne* 7(1): e29636. doi:  
34 10.1371/journal.pone.0029363
- 35 Vallone PM, Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and  
36 hairpin structures. *Biotechniques* 37(2):226-231
- 37 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-  
38 CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in  
39 microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538

- 1 Wood HM, Griswold CE, Spicer GS (2007) Phylogenetic relationships within an  
2 endemic group of Malagasy 'assassin spiders' (Araneae, Archaeidae): ancestral  
3 character reconstruction, convergent evolution, and biogeography. *Mol*  
4 *Phylogenet Evol* 45(2):612-619
- 5 Zanella CM, Turchetto C, Palma-Silva C, Sperb-Ludwig F (2017) Microssatélites:  
6 Metodologias de Identificação e Análises. In: Turchetto-Zolet AC, Turchetto C,  
7 Zanella CM, Passaia G. Marcadores Moleculares na Era Genômica:  
8 Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética,  
9 pp.94-113.
- 10 Zimmer SM, Krehenwinkel H, Schneider JM (2014) Rapid range expansion is not  
11 restricted by inbreeding in a sexually cannibalistic spider. *PLoS ONE* 7: e95963

## 12 **Recursos da Internet**

- 13 Andrews S (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput  
14 Sequence Data [Online]. Available online  
15 at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- 16 Raymond M, Rousset F (1995) **GENEPOP** on the Web (Version 3.4), 1995.  
17 Online at <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/> Updated from Raymond &  
18 Rousset.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

### Capítulo 3

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE *Ctenus ornatus*  
(LYCOSOIDEA: CTENIDAE) EM ÁREAS DE PRESERVAÇÃO DA  
MATA ATLÂNTICA

1 Diversidade genética e estrutura de *Ctenus ornatus* (Lycosoidea: Ctenidae) em  
2 áreas de preservação da Mata Atlântica.

3  
4 Analiza Fernanda Cavenagh<sup>1</sup>, Camila Satie Savada<sup>1</sup>, Matheus Pires Rincão<sup>2</sup>,  
5 Antonio Domingos Brescovit<sup>3</sup>, Fernanda Simões de Almeida<sup>1</sup>

6  
7 <sup>1</sup>Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-  
8 Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná  
9 – Brasil

10 <sup>2</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Centro de Ciências Biológicas - Campus Luiz  
11 Meneghel, Bandeirantes, Paraná - Brasil

12 <sup>3</sup>Laboratório de Coleções Zoológicas – Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP - Brasil

## 13 **Resumo**

14 Ctenidae é uma família de aranhas ecologicamente importante para manter o  
15 equilíbrio dos ecossistemas em que habitam, atuando no controle na dinâmica  
16 populacional de insetos e de outras presas. Conhecer a estrutura das  
17 populações bem como os indicadores de diversidade genética pode ajudar na  
18 conservação, quando necessário, a orientar ações de manejo e conservação das  
19 espécies. Os marcadores microssatélites são uma das mais utilizadas  
20 ferramentas para em estudos genéticos populacionais, e o sequenciamento de  
21 nova geração (NGS) tem possibilitado o acesso a novos microssatélites com  
22 maior eficiência e menor custo. Assim, este estudo teve como objetivo investigar  
23 a diversidade genética e estrutura populacional de populações de *Ctenus*  
24 *ornatus* amostradas em áreas de preservação do estado do Paraná. As  
25 localidades amostradas são, na região dos campos gerais, o Parque Estadual  
26 de Vila Velha (PEVV); na região norte o Parque Estadual Mata dos Godoy  
27 (PEMG); na região litorânea o Parque Nacional de Superagui (PNS) e na região  
28 oeste o Parque Nacional do Iguaçu (PNI). Nas análises foram usados  
29 marcadores microssatélites, onde foram amplificados seis loci e genotipados 110  
30 indivíduos, identificando 105 alelos. Com relação a diversidade alélica, a menor  
31 ocorrência de alelos privados e o menor índice  $F_{IS}$  foi da população de PEVV.  
32 Na análise AMOVA a maior variação foi entre os indivíduos. Na diferenciação  
33 genética par a par, foram observados valores significativos para os quatro pontos  
34 de amostragem. Nossos dados demonstram que o isolamento por distância  
35 parece não ser responsável pela estruturação alta das populações, pois os  
36 valores de  $F_{ST}$  e as distâncias geográficas não estão correlacionadas. Apesar da  
37 possibilidade de a atividade antrópica afetar a variabilidade genética de algumas  
38 espécies, a estrutura populacional pode ser consequência de processos naturais  
39 antigos.

40

41 **Palavras-chave:** Ctenidae; Conservação; Genoma; NGS; Populacional; SSR.

42

43

44

## 1 **Introdução**

2           As aranhas constituem uma parte expressiva dos artrópodes terrestres e  
3 estão bem distribuídas mundialmente. Sendo o Brasil, um país muito rico na  
4 constituição de espécies do grupo, apresentando 76 das 136 famílias de aranhas  
5 registradas no mundo [1, 2]. Uma família bem distribuída pelas reservas do país  
6 é Ctenidae, que possui 603 espécies alocadas em 48 gêneros, onde 115 delas  
7 se encontram no território brasileiro, incluindo *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877)  
8 [2]. As aranhas Ctenidae são promissoras para monitoramento da diversidade  
9 de invertebrados em florestas tropicais [3] e estudos filogeográficos [4].

10           Muitas espécies de Ctenidae estão associadas diretamente a um  
11 ambiente de mata preservada, devido ao grupo possuir muitas espécies  
12 arborícolas, ainda assim muitas delas são encontradas em borda de mata, por  
13 se alimentarem de espécies de Lycosidae, promovendo um comportamento  
14 errante [5, 6]. Comportamento esse observado melhor nos machos, uma vez que  
15 apresentam a procura em busca das fêmeas, somado aos comportamentos  
16 antipredatório e de forrageio, que os tornam até 3,5 vezes mais ativos que as  
17 fêmeas [7].

18           Essas aranhas têm capacidade de bioindicador de qualidade ambiental,  
19 já que são exigentes quanto as condições do habitat e mais vulneráveis às  
20 alterações na estrutura da vegetação [8, 9]. Possuem indivíduos de pequeno a  
21 grande porte, são caçadoras ativas, noturnas e de alimentação exclusivamente  
22 carnívora como grande parte do grupo das aranhas [5, 10, 11, 6].

23           De modo que, acabam por constituir um modelo de estudo na questão  
24 de monitoramento e estratégias de conservação, já que espécies de um mesmo  
25 grupo podem possuir tipos de dispersão diferentes [12 – 15], podendo notar os  
26 efeitos da fragmentação, que podem afetar ou não a composição da genética  
27 das populações [16 – 18].

28           Contudo, existem poucos trabalhos que avaliam o impacto da  
29 fragmentação populacional na variabilidade genética das populações de  
30 aranhas, e tais estudos são inexistentes para *C. ornatus*. Em relação a Ctenidae,  
31 dois trabalhos recentes trouxeram informações, como a análise populacional  
32 realizada na Colômbia com a espécie de *Ancylometes bogotensis* (Keyserling,

1 1877), onde os autores detectaram uma influência da Cordilheira Oriental dos  
2 Andes Colombianos sobre a diversificação genética da espécie analisada [19], e  
3 o estudo [20] da espécie *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) identificando  
4 uma forte diferenciação genética entre as populações, sendo o maior valor  
5 evidenciado até o momento, demonstrando a sensibilidade da espécie ao  
6 isolamento populacional.

7       Trabalhos como estes são necessários na compreensão dos riscos ao  
8 qual as populações estão expostas, principalmente em áreas impactadas.  
9 Assim, este estudo busca investigar a diversidade e estrutura de *C. ornatus* em  
10 Unidades de Conservação (UCs) do estado do Paraná, usando de marcadores  
11 microssatélites, buscando investigar a variabilidade genética das populações.

## 12 **Material e Métodos**

### 13       COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA

14       Foram utilizados 110 espécimes de *Ctenus ornatus* de quatro Unidades  
15 de Conservação do estado do Paraná, sendo elas: Parque Estadual Mata do  
16 Godoy (PEMG) – Londrina (23°26'29.37"S 51°14'31.86"O), Parque Estadual de  
17 Vila Velha (PEVV) – Ponta Grossa (25°15'15.40"S 50°00'11.30"O), Parque  
18 Nacional do Iguaçu (PNI) – Foz do Iguaçu (25°37'34.00"S 54°28'35.40"O) e  
19 Parque Nacional de Superagui (PNS) – Guaraqueçaba (25°21'4.31"S  
20 48°12'3.27"O) (**Tabela1**).

21       Os espécimes foram coletados por busca ativa, utilizando como material  
22 de coleta potes plásticos e uma lanterna de cabeça (as coletas foram noturnas,  
23 período de maior atividade desses animais). Após a catalogação dos espécimes  
24 foi retirado o material de tecido muscular das pernas para posteriores análises  
25 moleculares. Os espécimes foram armazenados em álcool 70% e enviados ao  
26 Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curador A. D.  
27 Brescovit) São Paulo/SP, Brasil, onde foram identificados e depositados na  
28 coleção.

29       O DNA genômico foi extraído do tecido muscular da perna das aranhas,  
30 a partir do protocolo com fenol-clorofórmio de Almeida, Fungaro e Sodré [21] e  
31 em gel de agarose foi verificada a integridade e quantidade do DNA obtido para  
32 posterior diluição.

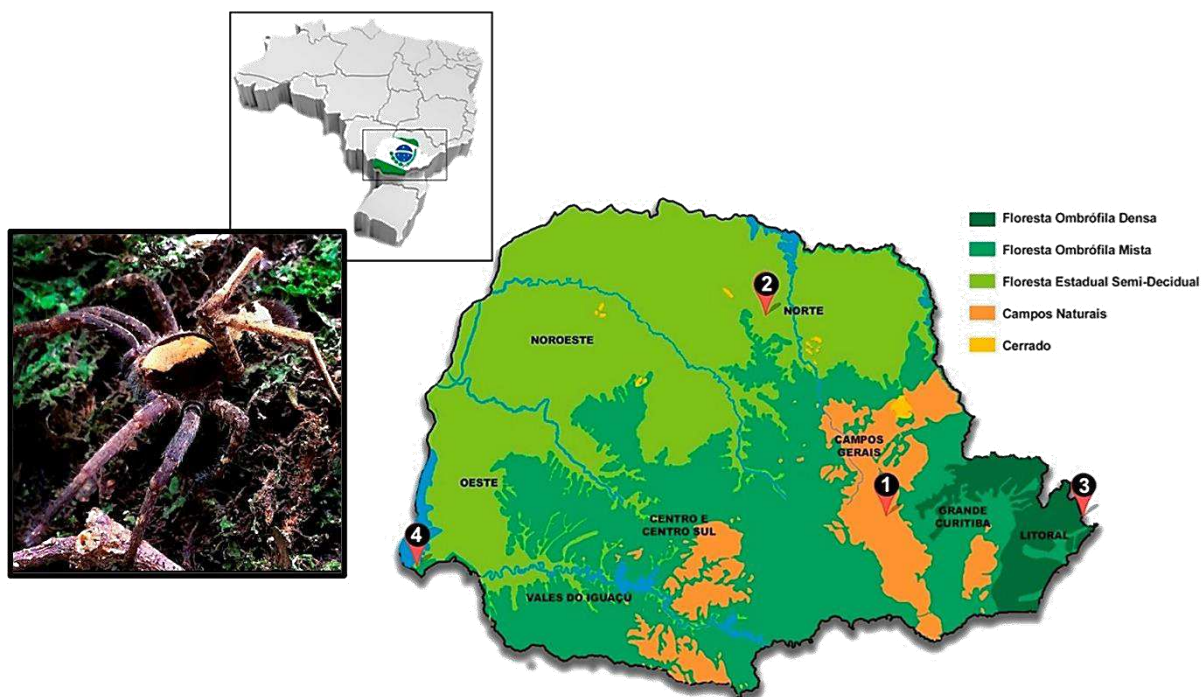
1 **Tabela 1** – Lista com os locais de coleta de *Ctenus ornatus* nas Unidades de  
 2 Conservação (UCs) do estado do Paraná, Brasil. N: número de indivíduos  
 3 coletados.

4

Sigla	N	Unidade de Conservação	Município
PEVV	34	Parque Estadual de Vila Velha	Ponta Grossa
PEMG	20	Parque Estadual Mata dos Godoy	Londrina
PNS	22	Parque Nacional de Superagui	Guaraqueçaba
PNI	34	Parque Nacional do Iguaçu	Foz do Iguaçu

5

6 **Figura 1** - Mapa do Brasil com indicação do estado do Paraná apresentando os  
 7 pontos de coleta. Os pontos de localização enumerados demarcam as Unidades  
 8 de Conservação. A legenda identifica no mapa os diferentes ecossistemas que  
 9 compõem os habitats do estado.



10 **Fonte:** Mariana Costa Terra (2023), adaptado pelo autor. Localização – 1: Parque Estadual de  
 11 Vila Velha; 2: Parque Estadual Mata dos Godoy; 3: Parque Nacional do Superagui; 4: Parque  
 12 Nacional do Iguaçu. Imagem de *Ctenus ornatus* – Foto de Matheus Pires Rincão, 2018.

### 13 PROTOCOLO MOLECULAR

14 Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com base no DNA  
 15 genômico total extraído de um dos espécimes coletados no PEVV (**Capítulo 2**).  
 16 A amostra foi encaminhada para o sequenciamento de nova geração em  
 17 sequenciador de plataforma Illumina NovaSeq, pelo método de genotipagem de

1 baixa cobertura (*paired-end* 2x150pb) executado pela empresa GenOne Biotech  
 2 (<https://www.genone.com.br/>). Os dados enviados foram analisados no  
 3 RepeatExplorer2 [21], os *contigs* gerado em cada simulação (rápida, longa e  
 4 extralonga de montagens) foram submetidos ao MISA-web [22]  
 5 (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) que faz a predição de  
 6 microssatélites. Os perfis dos *primers* microssatélites utilizados são mostrados  
 7 na **Tabela 2**.

8  
 9 **Tabela 2 – Primers microssatélites desenvolvidos de *Ctenus ornatus***

Nome dos locos	Sequências de <i>primers</i> (5' - 3')	T (°C)	Tam. do alelo (pb)
Cteo01	F: GCTTAGGGACAGACAGGCAT R: CATTTC AATGCTTACCGGGG	56	195-219
Cteo02	F: GCGAAAATGCGGACAAATGA R: GGAGTAGCCCTTCATAGCCC	57	213-221
Cteo11	F: AGAGGGATGAGATGAGCTTTGT R: ACTCTGCACCCACACTATTG	61	119
Cteo12	F: TCTCTGCACCCACACTATTG R: AGAGGGATGAGATGAGCTTTGT	57	243-275
Cteo14	F: AGAGCGCTGAGGAAATTTTGA R: AGAGTGAAAGTGAATCGAGACAG	55	241-273
Cteo15	F: GCACTTTTCGAGCCTCCATTT R: TGCAATTTGGAGTAGAGGCATG	57	156-170

12 Abreviaturas: T (°C), Temperatura de pareamento.

### 13 ANÁLISES GENÉTICA POPULACIONAL

14 O tamanho dos alelos foi determinado manualmente usando o programa  
 15 GeneMarker v.2.2.0 (SoftGenetics). No Micro Checker v.2.2.3 [25] alelos nulos,  
 16 desistências de alelos e erros de anotação foram verificados. O número de alelos  
 17 por *locus* ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ )  
 18 foram obtidos em GenAlEx v.6.5 [26]. O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi  
 19 calculado no Arlequin programa v.3.5.2.2 [27]. A estimativa de equilíbrio de  
 20 Hardy Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação, com as correções de  
 21 Bonferroni, foram realizadas no GENEPOP v.1.2 [28, 29].

22 O *software* Structure v.2.3 [30] foi utilizado para obter a estruturação  
 23 populacional dos grupos amostrados, sendo estimado o número de *clusters* ( $K$ )  
 24 mais prováveis via análise Bayesiana. Foram testadas as possibilidades da  
 25 existência de uma a oito populações e a análise de cada  $K$  foi repetida 20 vezes,  
 26 com 10.000 interações no *burn-in* e 100.000 interações na Cadeia de Markov

1 Monte Carlo (MCMC). Os aplicativos *online* Structure Harvester 0.6.93 [31] e  
2 Clumpak (<http://clumpak.tau.ac.il/>) [32] foram utilizados para inferir  
3 estatisticamente qual  $K$  mais provável e para agrupar os resultados de Structure  
4 via método  $\Delta K$  de Evanno [33].

## 5 **Resultados e Discussão**

6

7

### DIVERSIDADE GENÉTICA

8 Foram genotipados um total de 110 indivíduos de *Ctenus ornatus* para  
9 seis *loci* microssatélites. As análises revelaram um total de 105 alelos ( $A$ ) entre  
10 as quatro populações, variando de 17 alelos (PEVV) a 34 (PNI) (**Tabela 3**). Os  
11 menores índices de diversidade genética ( $N_A = 3,400$ ;  $N_E = 2,040$ ), foram obtidos  
12 na população do PEVV. As estimativas de heterozigosidade esperada ( $H_E$ )  
13 indicaram um nível moderado de diversidade alélica entre as populações, onde  
14 a maior foi na população do PNI = 0,700 e a menor na população do PEVV =  
15 0,459. O maior número de alelos privados ( $N_P$ ) foi obtido na população do PNI =  
16 15, e o menor obtido na população do PEVV = 2 (**Tabela 3**).

17 Nenhuma das comparações entre os *loci* apresentaram desequilíbrio de  
18 ligação, sugerindo que os mesmos podem ser considerados marcadores  
19 independentes. Algumas populações apresentam desvios do HWE para alguns  
20 *loci*. Na população do PEVV os *loci* Cteo01, Cteo14 e Cteo15, nas populações  
21 dos PEMG e PNS os *loci* Cteo02 e Cteo15, e a na população do PNI trouxe  
22 valores significativos para todos os *loci* (**Tabela S1**).

23 Com relação ao  $F_{IS}$ , que mede o desvio das proporções do HWE, onde  
24 valores positivos indicam deficiência de heterozigotos, enquanto valores  
25 negativos indicam excesso de heterozigotos [34]. O que podemos observar em  
26 todas as nossas populações (**Tabela 3**), já que essas apresentam valores altos  
27 negativos indicando ausência de endogamia. Onde o maior valor foi encontrado  
28 no PEMG = -0,719 e o menor valor no PEVV = -0,537.

29 Já o índice de diversidade genética ( $F_{ST}$ ) levando em consideração o nível  
30 de significância, de acordo com Wright [35]: 0,05 – 0,15 corresponde à  
31 diferenciação genética moderada entre as populações e 0,15 – 0,25 ou superior

1 indica alta diferenciação entre as populações. Os resultados baseados nas  
 2 estatísticas de  $F$  sobre todas as populações para cada *locus*, a maior proporção  
 3 de diversidade gênica entre as populações ( $F_{ST}$ ) foi encontrada para o *locus*  
 4 Cteo12 ( $F_{ST} = 0,304$ ) (**Tabela S2**).

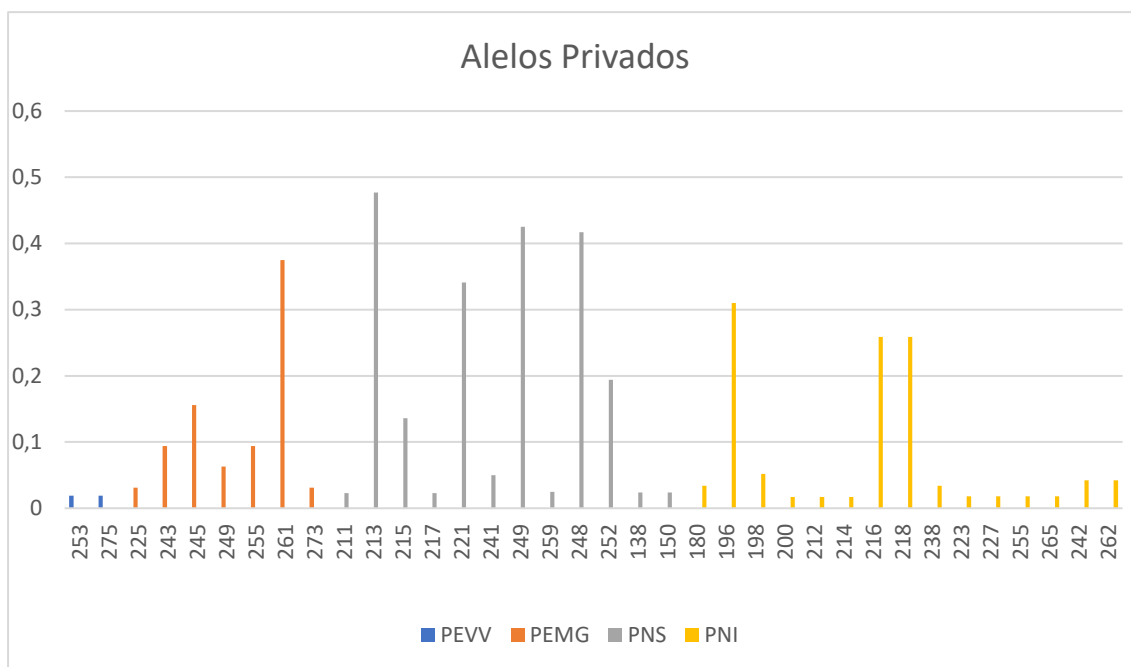
5 **Tabela 3** – Diversidade genética de *Ctenus ornatus*, obtida a partir de  
 6 marcadores microssatélites. N: número de indivíduos analisados; A: número total  
 7 de alelos;  $N_A$ : número médio de alelos;  $N_E$ : número de alelos efetivos;  $N_P$ : número  
 8 de alelos privados;  $H_O$ : Heterozigosidade observada;  $H_E$ : Heterozigosidade  
 9 esperada;  $F_{IS}$ : índice de fixação dentro das populações.

Local	N	A	$N_A$	$N_E$	$N_P$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
<b>PEVV</b>	34	17	3,400	2,040	2	0,727	0,459	-0,537
<b>PEMG</b>	20	25	5,000	3,209	7	0,988	0,662	-0,719
<b>PNS</b>	22	29	5,800	3,067	12	0,989	0,663	-0,653
<b>PNI</b>	34	34	6,800	3,483	15	0,963	0,700	-0,626
<b>Total</b>	110	105	5,250	2,950	-	0,917	0,621	-

10 Parque Estadual de Vila Velha (PEVV); Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG); Parque  
 11 Nacional do Superagui (PNS); Parque Nacional do Iguaçu (PNI).

12 A quantidade de alelos encontrados por locus variou de 7 (Cteo15) a 17  
 13 (Cteo14), sendo este o *locus* mais polimórfico, e o tamanho dos alelos variou de  
 14 138 a 275 pares de bases (pb) (**Figura S1**). Os *loci* Cteo02 e Cteo14  
 15 apresentaram somente dois alelos na população do PEVV e Cteo15 na  
 16 população do PEMG. Já o *locus* Cteo01 foi o que apresentou a maior quantidade  
 17 de alelos em uma população ( $PNI = 9$ ), sendo todos eles exclusivos deste grupo  
 18 (Figura S1).

- 1 **Figura 2** - Frequência de alelos privados amostrados nas quatro populações de  
 2 *Ctenus ornatus*, de um total de 105 alelos, por meio de cinco *loci* microssatélites.  
 3 Eixo x: os alelos; y: a frequência em sua população.



4

5 Por meio da avaliação dos cinco marcadores microssatélites, foi possível  
 6 constatar que as quatro populações apresentavam alelos privados (**Figura 2**)  
 7 (**Tabela S3**). Do total de 105 alelos amostrados foram encontrados 36 alelos  
 8 privados, constituindo, portanto, 35,7% dos alelos totais. Duas populações  
 9 apresentaram maior número de alelos privados, com 12 (Parque Nacional do  
 10 Superagui - (PNS)) e 15 (Parque Nacional do Iguaçu - (PNI)).

11 Os alelos privados, mesmo sendo influenciados pelo tamanho amostral,  
 12 são de grande importância para os estudos populacionais e servem como base  
 13 nas estratégias de conservação, além de serem indicadores de fluxo gênico [36  
 14 – 38]. O alelo 213 (locus Cteo02), observado na população PNS possui a maior  
 15 frequência entre os alelos destacados, o que o torna interessante para estudos  
 16 visando a conservação (**Figura 2**) (**Tabela S3**).

17

18

19

## 1           ESTRUTURA GENÉTICA

2           Na análise de variância molecular (AMOVA), foi possível observar que a  
3           variação entre as populações foi de 18%, entre os indivíduos e dentro das  
4           populações 0% e dentro os indivíduos 82%, sendo a maior variação. Logo, a  
5           variação está ocorrendo independente das populações, indicando que as  
6           populações não são tão distantes geneticamente (**Tabela 4**). Apesar do  $F_{ST} =$   
7           0,209 ( $p=0,001$ ) entre as populações evidenciar a diferença genética entre elas.

8           **Tabela 4** – Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ctenus*  
9           *ornatus* das quatro populações estudadas, mostrando a porcentagem de  
10          variação entre populações, entre os indivíduos das populações e dentro dos  
11          indivíduos.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre Populações	3	76,237	0,446	18%
Entre Indivíduos	106	145,149	0,000	0%
Dentro de Indivíduos	110	220,000	2,000	82%
Total	219	379,204	2,446	100%

$F_{ST} = 0,209$  ( $p=0,001$ )

12

13          Com relação a diferenciação genética par a par, foram observados valores  
14          significativos para os quatro pontos de amostragem (**Tabela 5**), levando em  
15          conta que na AMOVA estimativas acima de 0,05 são consideradas indicadores  
16          de alta estruturação populacional [39], podendo concluir que as populações  
17          analisadas se encontram geneticamente estruturadas, sendo a população do  
18          Parque Nacional do Superagui (PNS) portadora do maior valor.

19

20

21

22

23

24

25

1 **Tabela 5** – Valores de  $F_{ST}$  par a par entre as populações de *C. ornatus*.

	PEVV	PEMG	PNS	PNI
PEVV	0,000			
PEMG	0,182*	0,000		
PNS	0,215*	0,152*	0,000	
PNI	0,167*	0,097*	0,119*	0,000

2 Legenda: Parque Estadual de Vila Velha (PEVV); Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG);  
 3 Parque Nacional do Superagui (PNS); Parque Nacional do Iguaçu (PNI). \*valores significativos  
 4 ( $p = 0,05$ )

5 A **Tabela 6** mostra os valores de identidade e distância genética de Nei  
 6 (1972) para todas as comparações par-a-par entre as populações. O maior valor  
 7 de identidade genética (0,524) e o menor valor de distância (0,646), foi entre as  
 8 populações do PEMG e do PNI.

9 **Tabela 6** - Matriz de distância genética (DG) e identidade genética (IG) de Nei  
 10 (distância genética de Nei (1972) abaixo a diagonal e identidade genética sobre  
 11 a diagonal).

	PEVV	PEMG	PNS	PNI
PEVV	-----	0,437	0,276	0,437
PEMG	0,827	-----	0,295	0,524
PNS	1,289	1,221	-----	0,378
PNI	0,829	0,646	0,973	-----

17 Legenda: Parque Estadual de Vila Velha (PEVV); Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG);  
 18 Parque Nacional do Superagui (PNS); Parque Nacional do Iguaçu (PNI).

19 Contudo, as populações distantes geograficamente deveriam tem maior  
 20 valor de distância genética, mas nossos resultados detectaram valor baixo entre  
 21 populações geograficamente distantes e vice-versa. Por exemplo, a distância  
 22 genética entre as populações PNS e PNI foi de 0,973; ainda que elas estejam  
 23 separadas geograficamente em torno de 818km. Já populações mais próximas  
 24 geograficamente em torno de 297km, como PEVV e PNS, apresentaram uma  
 25 distância de 1,289 (**Figura 1**) (**Tabela 6**).

1 Estudos populacionais com aranhas geralmente associam a estrutura  
2 genética as taxas de dispersão de cada espécie [12, 40 - 42]. Analisando as  
3 quatro populações de *C. ornatus*, pode se observar índices altos nas estatísticas  
4 de  $F$  e com estruturação genética, reafirmando a capacidade de dispersão dos  
5 indivíduos de forma mista, onde as fêmeas são mais territorialistas e os machos  
6 tendem a percorrer maiores distâncias [43].

7 Os resultados demonstram que o isolamento por distância parece não ser  
8 o único responsável pela estruturação alta das populações, pois os valores de  
9  $F_{ST}$  e as distâncias geográficas não estão correlacionadas. Podemos observar  
10 que populações mais próximas, como PEVV e PNS (297Km) (**Figura 1**) tem o  
11 maior  $F_{ST}$  (0,215). Assim como, valores de  $F_{ST}$  relativamente baixos entre  
12 populações distantes uma das outras, por exemplo, 513Km (**Figura 1**). Regiões  
13 urbanizadas ou próximas a agro-ecossistemas podem interferir na estruturação  
14 [44].

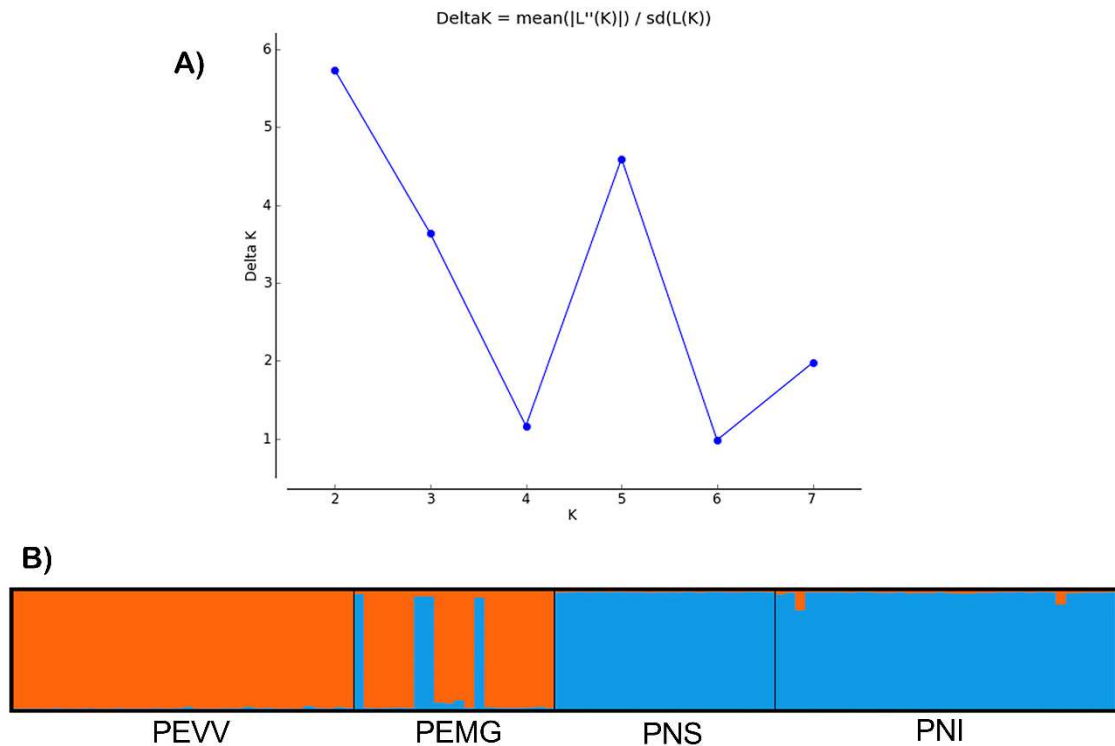
15 Contudo, apesar da possibilidade de atividade antrópica afetar a  
16 variabilidade genética de algumas espécies, a estrutura populacional pode ser  
17 consequência de processos naturais antigos. Como relatado por Colgan et al.  
18 [14], em um estudo na família Lycosidae, onde eles observaram que as  
19 divergências genéticas interpopulacionais não tinham relação com as distâncias  
20 geográficas, ou seja, a população já era estruturada antes mesmo da  
21 fragmentação antrópica do local. Mas, as espécies de Lycosidae são mais  
22 adaptáveis as mudanças do habitat. Com relação a *C. ornatus*, que possui uma  
23 sensibilidade maior a alterações do ambiente ao qual esteja inserida, devendo  
24 assim ser analisada com maior cautela.

25 Na análise bayesiana foi obtido um  $K$  provável igual a dois (Figura 3-A). A  
26 população do PNS mostrou um padrão mais homogêneo, com menos mistura,  
27 entre seus 22 indivíduos analisados (Figura 3-B).

28

1 **Figura 3 – (A)** Estimativa do número de agrupamento ( $K$ ) a partir de estatística  
 2  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005). **(B)** Representação gráfica do agrupamento  
 3 bayesiano ( $K=2$ ), gerado a partir de seis loci de microssatélites para os quatro  
 4 pontos analisados de *Ctenus ornatus*. PEVV: Parque Estadual de Vila Velha;  
 5 PEMG: Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS: Parque Nacional do Superagui;  
 6 PNI: Parque Nacional do Iguaçu.

7



8            Estudos com aranhas vem sugerindo que fragmentos maiores, mais bem  
 9 preservados e menos isolados, propendem a indicar índices de diversidade mais  
 10 elevados. Bonte e colaboradores [45], identificaram que a capacidade de  
 11 dispersão e a estruturação do habitat no grupo das aranhas influencia  
 12 diretamente em sua distribuição. Sugerindo que a ocorrência de possíveis  
 13 metapopulações tenham um desempenho significativo sobre a distribuição do  
 14 grupo e tendem a prevenir prejuízos ligados a fragmentação sob espécies com  
 15 nichos mais restritos [46]. Reafirmando que as aranhas são mais afetadas pela  
 16 redução do habitat.

17  
 18  
 19  
 20  
 21

## 1 **Conclusão**

2           Independente da metodologia utilizada para as análises de diversidade  
3 genética, muitos dos estudos populacionais com aranhas vem a atribuir sua  
4 variabilidade a características intrínsecas de cada espécie, como as aranhas  
5 sociais que não se dispersam muito tendem a possuir uma variabilidade genética  
6 baixa dentro das suas populações, e conseqüentemente altas taxas de  
7 endocruzamento. Contudo, a maioria das aranhas (incluindo a família Ctenidae)  
8 possui hábitos não sociais e acabam sendo territorialistas, o que pode contribuir  
9 para a variabilidade observada, assim como os fragmentos analisados das UCs  
10 que possuem uma grande área e são mais preservados e menos isolados,  
11 reafirmando maiores índices de diversidade.

12           A fragmentação do habitat pode prejudicar diretamente a biodiversidade,  
13 já que o tamanho dos fragmentos e a conectividade entre eles desempenha  
14 grande ação sobre a estrutura das populações. Em vista disso, as aranhas,  
15 apesar de um grupo de alta variabilidade de modos de se dispersar, formam um  
16 ótimo modelo para estudos de fragmentação.

## 17 **Referencias**

- 18 **[1]** Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA, Griswold  
19 CE, et al. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene  
20 analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*. 2016; 33(6):574-616.
- 21 **[2]** World Spider Catalog. World Spider Catalog. Version 19.5. Natural History  
22 Museum Bern, 2024. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2
- 23 **[3]** Jocqué R, Samu F, Bird T. Density of spiders (Araneae: Ctenidae) in Ivory  
24 Coast rainforests. *J Zool*. 2005; 266(1):105-110.
- 25 **[4]** Rego FNAA. Variação na estrutura da comunidade de aranhas (Araneae,  
26 Arachnida) ao longo da calha do Rio Amazonas, Brasil. Unpublished D. Phil.  
27 Thesis, Universidade de Brasília. 2009.
- 28 **[5]** Foelix RF. 'Biology of Spiders.' 3rd ed. Oxford University Press: New York;  
29 2011.
- 30 **[6]** Polotow D, Brescovit AD. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider  
31 subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zool J Linn Soc*. 2014;  
32 170:333-361.

- 1 [7] Schmitt A, Schuster M, Barth FG. Daily locomotor activity patterns in three  
2 species of *Cupiennius* (Araneae, Ctenidae): The males are the wandering  
3 spiders. J of Arachnol.1990;18: 249-255.
- 4 [8] Rego FNAA, Venticinque EM, Brescovit AD. Densidade de aranhas errantes  
5 (Ctenidae e Sparassidae, Aranae) em uma floresta fragmentada. Biota Neotrop.  
6 2005; 5(1a): BN002051a
- 7 [9] Mestre LAM, Gasnier TRJ. Populações de aranhas errantes do gênero  
8 Ctenus em fragmentos florestais na Amazônia Central. Acta Amazon. 2008; 38:  
9 159- 164.
- 10 [10] Jocqué R, Dippenaar-Schoeman AS, Zoologin S. Spider families of the  
11 world, 2006.
- 12 [11] Gonzaga MO, Santos AJ, Japyassú HF. Ecologia e comportamento de  
13 aranhas. Editora Interciência, 2007.
- 14 [12] Ramirez MG, Fandino LB. Genetic variability and gene flow in *Metepeira*  
15 *ventura* (Araneae, Araneidae). J Arachnol. 1996; 24:1-8, 1996.
- 16 [13] Ramirez MG, Haakonsen KE. Gene flow among habitat patches on a  
17 fragmented landscape in the spider *Argiope trifasciata* (Araneae: Araneidae).  
18 Heredity. 1999; 83:580-585.
- 19 [14] Colgan DJ, Brown S, Major RE, Christie F, Gray MR, Cassis G. Population  
20 genetics of wolf spiders of fragmented habitat in the wheat belt of New South  
21 Wales. Mol Ecol. 2002; 11:2295-2305.
- 22 [15] Marshall SD, Walker SE, Rypstra AL. Two ecologically divergent generalist  
23 predators have different responses to landscape fragmentation. Oikos. 2006;  
24 114:241-248.
- 25 [16] Fahrig L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of  
26 Ecology, Evol Syst. 2003; 34:487-515.
- 27 [17] Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C. Genetic resource  
28 impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and  
29 predicted theory for neotropical trees. Heredity. 2005; 95:255-273.
- 30 [18] Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudio KR. Habitat fragmentation  
31 reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the  
32 Brazilian Atlantic Coastal Forest. Biol Conserv. 2009; 142:1560-1569.
- 33 [19] Salgado-Roa FC, Gamez A, Sanchez-Herrera M, Pardo-Diaz C, Salazar C.  
34 Divergence promoted by the northern Andes in the giant fishing spider  
35 *Ancylometes bogotensis* (Araneae: Ctenidae). Biol J Linn Soc. 2021; 132(3):495-  
36 508.
- 37 [20] Almeida FS, Fungaro MHP, Sodr e LMK. RAPD and isoenzyme analysis of  
38 genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae)  
39 from the Tibagi River, Brazil. J Zool. 2001; 253(1):113-120.

- 1 [21] Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. RepeatExplorer: a  
2 Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic  
3 repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinform.* 2013;  
4 29(6):792-793.
- 5 [22] Beier S, Thiel T, Münch T, Scholz U, Mascher M. MISA-web: a web server  
6 for microsatellite prediction. *Bioinform.* 2017; 33:2583–2585.  
7 dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198
- 8 [23] Rozen S, Skaletsky HJ. Primer 3 on the www for general users and for  
9 biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in*  
10 *Molecular Biology* (Krawetz, S. & Misener, S., ed.), Totowa, NJ: Humana Press;  
11 2000. pp.365-386.
- 12 [24] Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and  
13 hairpin structures. *Biotechniques.* 2004; 37(2):226-231.
- 14 [25] Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. MICRO-CHECKER:  
15 Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.  
16 *Mol Ecol Notes.* 2004; 4:535–538.
- 17 [26] Peakall ROD, Smouse PE. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel.  
18 Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes.* 2006;  
19 6(1):288–295.
- 20 [27] Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs  
21 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res.*  
22 2010; 10:564-567.
- 23 [28] Raymond M, Rousset F. **GENEPOP** on the Web (Version 3.4), 1995. Online  
24 at <http://wbio.ed.curtin.edu.au/genepop/> Updated from Raymond & Rousset.
- 25 [29] Rousset F. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop  
26 software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res.* 2008; 8:103-106.
- 27 [30] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure  
28 using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000; 155(2):945-959.
- 29 [31] Earl DA. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing  
30 STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservat Genetics*  
31 *Resour.* 2012; 4(2):359-361.
- 32 [32] Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. Clumpak:  
33 a program for identifying clustering modes and packaging population structure  
34 inferences across K. *Mol Ecol Res.* 2015; 15(5):1179-1191.
- 35 [33] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of  
36 individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 2005;  
37 14(8):2611-2620.

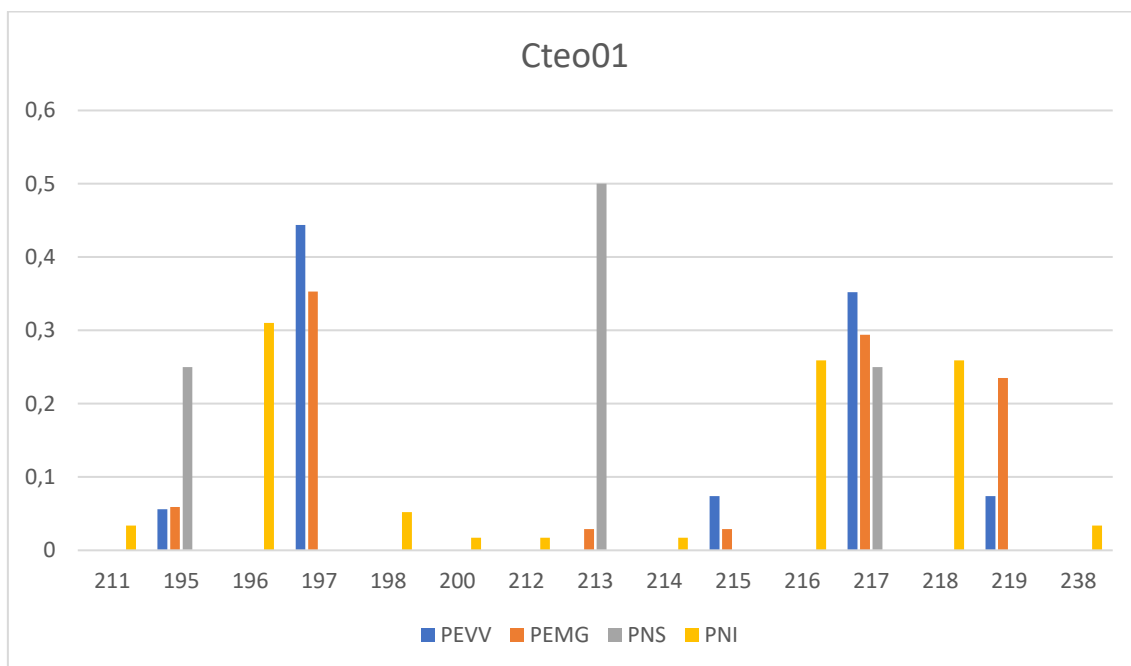
- 1 [34] Moreira AA, Hilsdorf AWS, Silva JV, Souza VRD. Variabilidade genética de  
2 duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites.  
3 *Pesqui Agropecu Bras.* 2007; 42:521-526.
- 4 [35] Wright S. *Evolution and Genetics of Populations*. Chicago: University of  
5 Chicago, 1978. 511pp.
- 6 [36] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele  
7 frequencies. *Genetics*. 1995; 139(1):457-462.
- 8 [37] Kalinowski ST. Counting alleles with rarefaction: private alleles and  
9 hierarchical sampling designs. *Conserv Genetics*. 2004; 5(4):539-543.
- 10 [38] Szpiech ZA, Rosenberg NA. On the size distribution of private microsatellite  
11 alleles. *Theor Popul Biol.* 2011; 80:100–113.
- 12 [39] Matioli SR. *Biologia molecular e evolução*. 1ª edição. Ribeirão Preto: Holos.  
13 2001.
- 14 [40] Vandergast AG, Gillespie RG, Roderick GK. Influence of volcanic activity on  
15 the population genetic structure of Hawaiian *Tetragnatha* spiders: fragmentation,  
16 rapid population growth and the potential for accelerated evolution. *Mol Ecol*.  
17 2004; 13:1729-1743.
- 18 [41] Johannesen J, Kiefer A, Veith M, Kral J. Genetic cohesion of *Eresus*  
19 *walckenaeri* (Araneae, Eresidae) in the eastern Mediterranean. *Biol J Linn Soc*.  
20 2005; 86:1-9.
- 21 [42] Bidegaray-Batista L, Macias-Hernandez N, Oromi P, Arnedo MA. Living on  
22 the edge: demographic and phylogeographical patterns in the woodlouse-hunter  
23 spider *Dysdera lancerotensis* Simon, 1907 on the eastern volcanic ridge of the  
24 Canary Islands. *Mol Ecol*. 2007; 16:3198-3214.
- 25 [43] Costa FG. Only one seeking sex: the best strategy for sexual meeting.  
26 *Evolutionary Theory*. 1999; 12:47-48.
- 27 [44] Bishop L, Riechert SE. Spider colonization of agroecosystems: mode and  
28 source. *Environ Entomol*. 1990; 19:1738-1745.
- 29 [45] Bonte D, Baert L, Lens L, Maelfait JP. Effects of aerial dispersal, habitat  
30 specialisation, and landscape structure on spider distribution across fragmented  
31 grey dunes. *Ecography*. 2004; 27:343-349.
- 32 [46] Peres EA. Estudo Genético de Populações de *Araneus venatrix* (Arachnida:  
33 Araneae) do Estado de São Paulo. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em  
34 Genética Animal e Evolução) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas,  
35 2010.
- 36
- 37
- 38

## 1 Material Suplementar

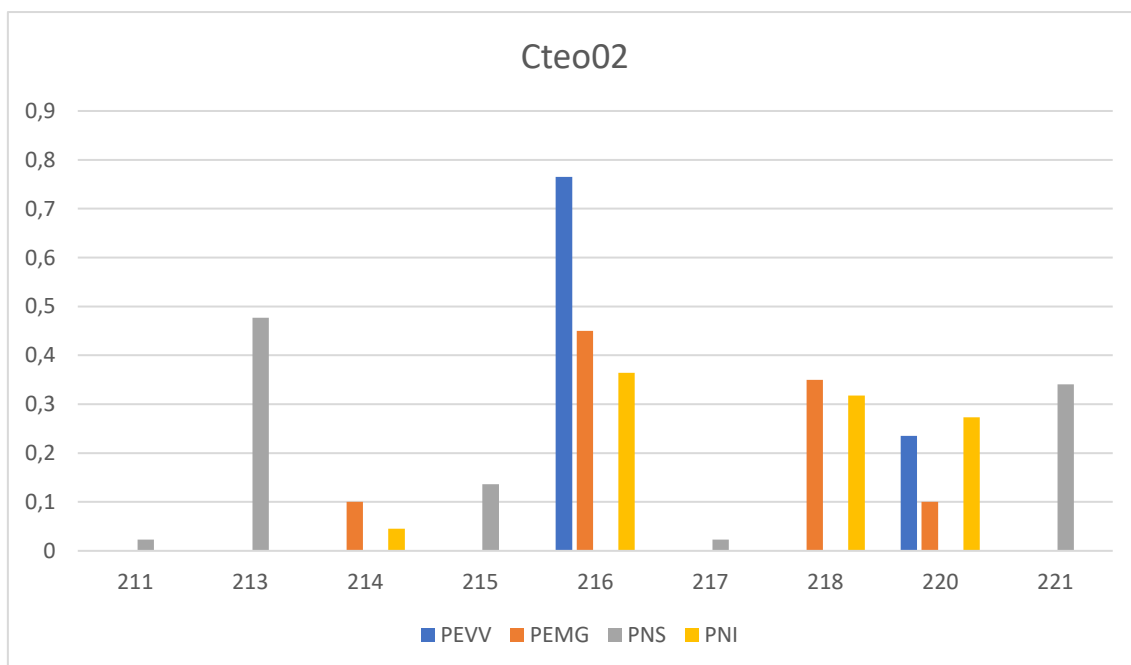
2

3 **Figura S1** - Frequências dos alelos por loco microsatélite de *C. ornatus* para os  
 4 quatro pontos estudados. PEVV: Parque Estadual de Vila Velha; PEMG: Parque  
 5 Estadual Mata dos Godoy; PNS: Parque Nacional do Superagui; PNI: Parque Nacional  
 6 do Iguaçu.

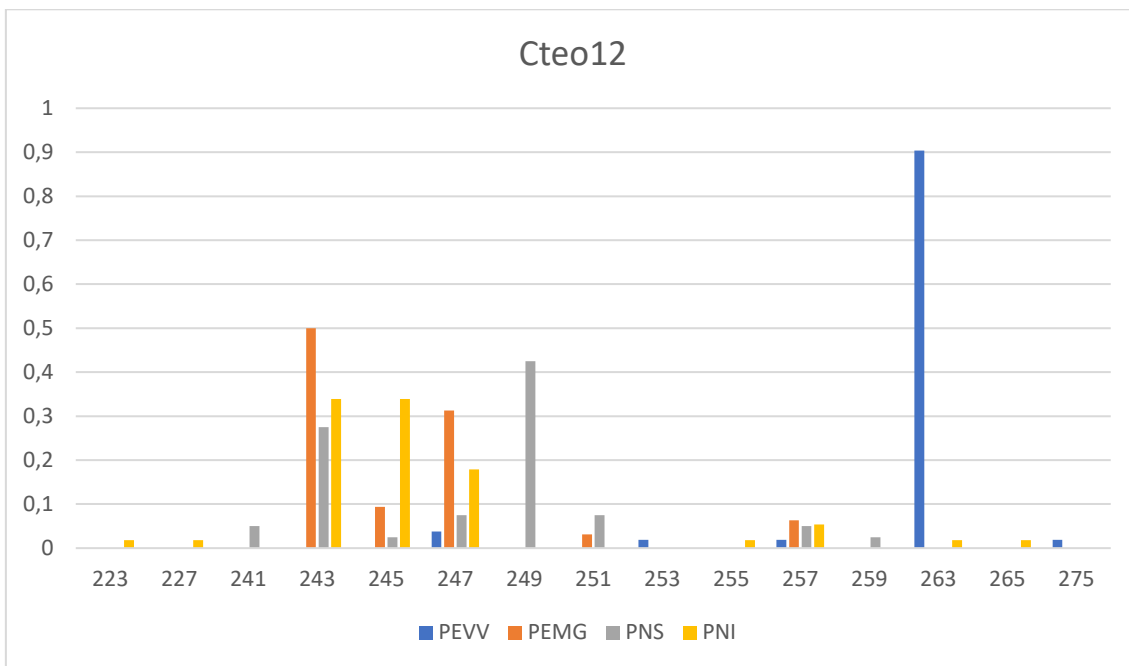
7



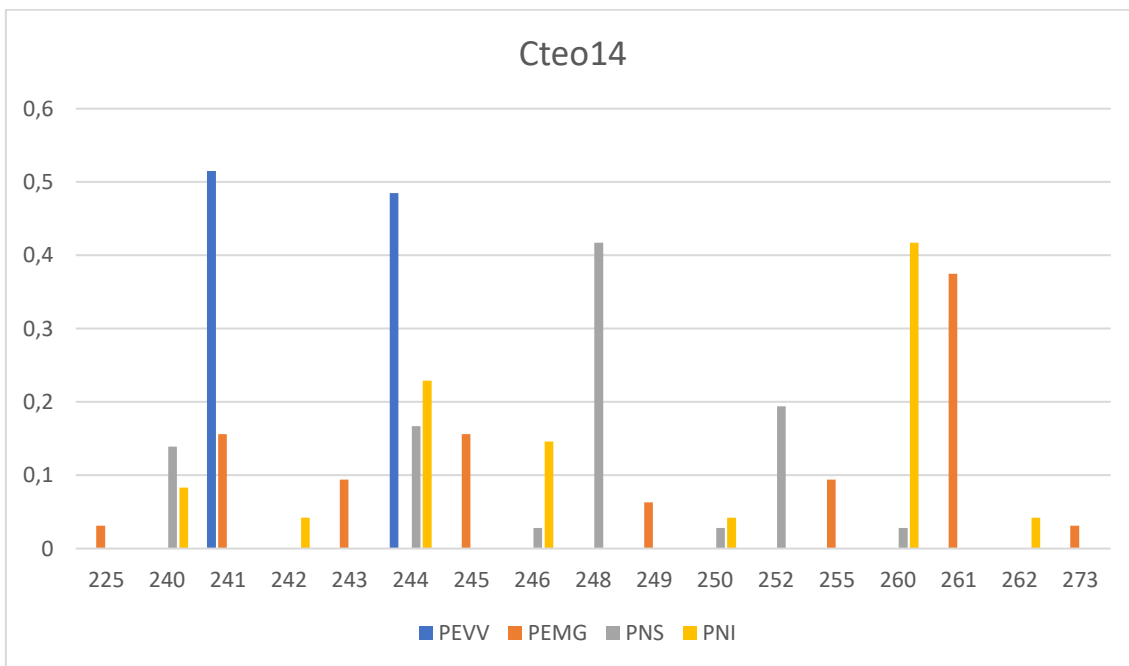
8



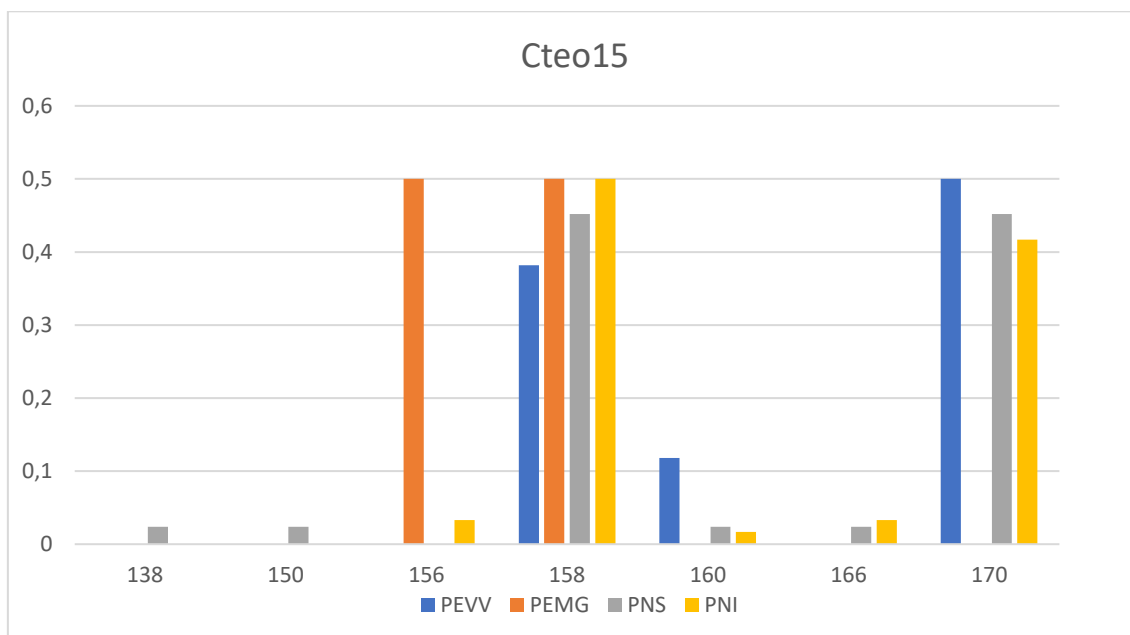
9



1



2



1

2

3 **Tabela S1** – Estimativas do Equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) nas populações  
4 por *loci*, com as correções de Bonferroni ( $\alpha/(n-i+1)$ ).

Locus	P-valor HWE			
	População			
	PEVV	PEMG	PNS	PNI
CTEO01	0*	0,0368	0,0133	0*
CTEO02	0,1485	0,0019*	0*	0,0002*
CTEO12	1	0,0089	0,2928	0*
CTEO14	0*	0,016	0,3002	0*
CTEO15	0*	0*	0*	0*

5 PEVV: Parque Estadual de Vila Velha; PEMG: Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS:  
6 Parque Nacional do Superagui; PNI: Parque Nacional do Iguaçu. \*valores significativos.

7

8 **Tabela S2** - Estatística *F* sobre todas as populações para cada locus.

9

10

Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
CTEO01	-0,405	-0,133	0,194
CTEO02	-0,482	-0,128	0,239
CTEO12	-0,373	0,044	0,304
CTEO14	-0,405	-0,104	0,215
CTEO15	-0,746	-0,506	0,138
<b>Média</b>	<b>-0,483</b>	<b>-0,165</b>	<b>0,218</b>

11

12

13

14

15

16

1 **Tabela S3** – Frequência de alelos privados amostrados nas quatro populações  
 2 de *Ctenus ornatus*, de um total de 105 alelos, por meio de cinco *loci*  
 3 microssatélites.

4

População	Locus	Alelos	Frequência
PEVV	Cteo12	253	0,019
PEVV	Cteo12	275	0,019
PEMG	Cteo14	225	0,031
PEMG	Cteo14	243	0,094
PEMG	Cteo14	245	0,156
PEMG	Cteo14	249	0,063
PEMG	Cteo14	255	0,094
PEMG	Cteo14	261	0,375
PEMG	Cteo14	273	0,031
PNS	Cteo02	211	0,023
PNS	Cteo02	213	0,477
PNS	Cteo02	215	0,136
PNS	Cteo02	217	0,023
PNS	Cteo02	221	0,341
PNS	Cteo12	241	0,050
PNS	Cteo12	249	0,425
PNS	Cteo12	259	0,025
PNS	Cteo14	248	0,417
PNS	Cteo14	252	0,194
PNS	Cteo15	138	0,024
PNS	Cteo15	150	0,024
PNI	Cteo01	180	0,034
PNI	Cteo01	196	0,310
PNI	Cteo01	198	0,052
PNI	Cteo01	200	0,017
PNI	Cteo01	212	0,017
PNI	Cteo01	214	0,017
PNI	Cteo01	216	0,259
PNI	Cteo01	218	0,259
PNI	Cteo01	238	0,034
PNI	Cteo12	223	0,018
PNI	Cteo12	227	0,018
PNI	Cteo12	255	0,018
PNI	Cteo12	265	0,018
PNI	Cteo14	242	0,042
PNI	Cteo14	262	0,042

5

6 Legenda: Parque Estadual de Vila Velha (PEVV); Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG);  
 7 Parque Nacional do Superagui (PNS); Parque Nacional do Iguaçu (PNI).

## 1 **Considerações Finais**

2 O uso de marcadores moleculares como o sequenciamento do COI, vem  
3 cada vez mais mostrando ser uma técnica vantajosa, especialmente porque  
4 permite a identificação de indivíduos independente de tamanho, sexo ou idade,  
5 algo que é uma limitação incisiva na identificação de aranhas. Assim sua  
6 utilização concomitante aos métodos de delimitação auxilia nas decisões  
7 taxonômicas, em apoio as linhas de evidência das características morfológicas  
8 e biogeográficas.

9 De maneira geral, os métodos de delimitação mostraram resultados  
10 similares as abordagens analisadas, demonstrando a proximidade de alguns  
11 grupos assim como a necessidade de investigações moleculares mais  
12 profundas, a fim de melhor observar certos complexos de espécies. Com esse  
13 trabalho, acresceremos ao banco de dados sequências de espécimes da região  
14 Neotropical e do Brasil. Corroborando com dados já existentes de estudos  
15 citogenéticos relacionados a Lycosidae, evidenciando o complexo de espécies  
16 de *Lycosa nordenskjoldi*, como o início de uma trajetória de especiação em  
17 *Trochosa*.

18 A partir de sequências produzidas com sequenciamento de nova geração  
19 de baixa cobertura, foi possível observar dados genômicos inéditos para *Ctenus*  
20 *ornatus*, contribuindo para enriquecer as informações no grupo dos aracnídeos.  
21 Além de identificar oito sequências que foram analisadas e identificadas para o  
22 desenvolvimento de *primers* microssatélites. O uso dessas regiões proporcionou  
23 estudos genéticos populacionais da espécie de *C. ornatus*, além da utilização  
24 dos marcadores em espécies próximas por meio da transferabilidade.  
25 Evidenciando que o uso de um sequenciamento de baixa cobertura também  
26 torna possível caracterizar e desenvolver marcadores moleculares para análises  
27 populacionais em aranhas.

28 Resultados sobre a diversidade genética e o nível de diferenciação  
29 genética da espécie geram informações importantes para a conservação, nossos  
30 dados apontam para uma variação gênica dentro dos indivíduos, sendo que  
31 entre as populações os valores de variabilidade genética são relativamente  
32 baixos.