



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA COSTA TERRA

**GENÔMICA POPULACIONAL DE *Enoploctenus cyclothorax*
(BERTKAU, 1880) (ARANEAE: CTENIDAE) EM FRAGMENTOS
FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

Londrina
2023



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



MARIANA COSTA TERRA

**GENÔMICA POPULACIONAL DE *Enoploctenus cyclothorax*
(BERTKAU, 1880) (ARANEAE: CTENIDAE) EM FRAGMENTOS
FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

Londrina
2023

MARIANA COSTA TERRA

**GENÔMICA POPULACIONAL DE *Enoploctenus cyclothorax*
(BERTKAU, 1880) (ARANEAE: CTENIDAE) EM FRAGMENTOS
FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

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: Profa. Dra. Renata da Rosa.
Coorientador: Prof. Dr. Matheus Pires Rincão.

Londrina
2023

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

T323g Terra, Mariana Costa.
Genômica populacional de *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica / Mariana Costa Terra. - Londrina, 2023.
118 f.

Orientador: Renata da Rosa.
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, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Aranhas - Tese. 2. Estrutura genética - Tese. 3. Diversidade críptica - Tese. 4. Filogeografia - Tese. I. Rosa, Renata da. 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

MARIANA COSTA TERRA

**GENÔMICA POPULACIONAL DE *Enoploctenus cyclothorax*
(BERTKAU, 1880) (ARANEAE: CTENIDAE) EM FRAGMENTOS
FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

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: Profa. Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Luiza de Moraes Magaldi
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP

Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Jaqueline Fernanda Dinonísio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de fevereiro de 2023.

“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco
que me cabe me dando por inteiro”

Ariano Suassuna

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas estiveram presentes durante a minha caminhada na pós-graduação e, em especial nos últimos anos, muitas delas contribuíram diretamente ou indiretamente no encerramento deste ciclo. A finalização deste trabalho traz junto uma realização pessoal, que só foi possível devido a colaboração de várias pessoas que dedicaram algum tempo para debater minhas inúmeras dúvidas. Assim, gostaria de expressar minha gratidão a todos que fizeram parte desta minha jornada até aqui.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela contribuição na minha formação profissional e pela compreensão depositada nos alunos afetados pela paralização das atividades por conta do Coronavírus (COVID-19). Também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante estes anos de doutorado, e à Fundação Araucária e Fundação Grupo Boticário pelo suporte financeiro ao projeto de Apoio à Biodiversidade do Paraná, que possibilitou a elaboração desta tese.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Fernanda Simões de Almeida, Dra. Mara Cristina de Almeida Matielo, Dra. Luiza de Moraes Magaldi e Dra. Jaqueline Fernanda Dionisio pela prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho e pelas correções em prol da melhora do mesmo. Agradeço também a Dra. Vera Nisaka Solferini pelas contribuições feitas no exame de qualificação.

À Dra. Ana Lúcia Dias pela orientação e amizade durante o mestrado e parte do doutorado. Sou imensamente grata pela oportunidade que me foi dada lá no início da pós-graduação, também pela confiança e incentivo para a realização desta tese. Com toda certeza este trabalho só existe por conta do apoio vindo da professora Ana, que me deu uma nova oportunidade mesmo quando eu não esperava. Obrigada por tanto, pela ótima orientação e pelo exemplo de profissionalismo no qual me espelho.

À Dra. Renata da Rosa por prontamente me acolher como orientanda e me apoiar na finalização deste ciclo. Apesar dos vários projetos em andamento aceitou a orientação com agrado, depositando em mim uma confiança que nem eu mesma enxergava. Obrigada pelo incentivo, pelas conversas e pelo apoio nessa reta final tão exaustiva. É um privilégio trabalhar com mulheres na pesquisa, obrigada por ser mais um exemplo na minha vida.

Ao meu coorientador Dr. Matheus Pires Rincão pela paciência no início do

doutorado quando tudo era novidade para mim, por todos os ensinamentos sobre as aranhas e principalmente por me acompanhar em todas as coletas realizadas. Este projeto possibilitou muitos aprendizados e sou grata por fazer parte deste time. Obrigada por tantas correções, conversas e debates sobre os dados e por intermediar contatos que foram extremamente importantes para a construção das ideias aqui propostas.

À professora Dra. Lucia Giuliano Caetano por tantas conversas no laboratório e por estar sempre disponível para uma dúvida, uma opinião e um ensinamento. Também ao professor Dr. Rogério Fernandes de Souza pela disponibilidade no início das análises, agradeço todo o suporte de bioinformática e todas as contribuições feitas neste manuscrito.

Aos ministrantes do Minicurso Introdução à Análises Genômicas Maria Imaculada Zucchi, Alessandro Alves Pereira e João Paulo Gomes Viana, da Unicamp, pela transmissão do conhecimento base que eu precisava para iniciar minhas análises genômicas. Também agradeço imensamente a Dra. Natácia Evangelista de Lima pelo incrível curso ministrado, Método DNA - Domínio Nas Análises, que foi um divisor de águas no meu processo de aprendizado. Sou muito grata pelo carinho e atenção depositados, e pela disponibilidade em responder um milhão de perguntas por mim feitas. Tais cursos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, pois me deram suporte para dominar as análises e interpretar os resultados de forma independente.

Aos amigos do laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular (LACEM), aos que por lá passaram e aos que permanecem até hoje, com quem aprendi muito nesses últimos anos. Em especial agradeço muito a Jaqueline, por todas as conversas sobre técnicas e protocolos, pelas discussões dos resultados e pelo apoio na bancada quando necessário. Agradeço de coração também a Kátia, Larissa, Stephany, Ana Beatriz, Thayná e João, que estiveram presentes no dia a dia do laboratório ou nos encontros esporádicos nessa reta final. Apesar de muito trabalho, no LACEM nós também rimos muito, dividimos nossas angústias e nos apoiamos sempre.

Aos meus queridos amigos Ana Paula, Jéssica Bernardes, Tiago Alvim, Moema, Jhonata e Ludierri, que estão comigo desde a graduação e que fazem parte das minhas melhores memórias. Aos meus irmãos da vida Jéssica Porfírio e Alexandre, por quem tenho enorme carinho. Obrigada por estarem presentes neste processo e continuarem fazendo parte da minha vida.

Por fim um agradecimento especial à minha família, sobretudo aos meus pais Selma e Luis Cesar que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta trajetória acadêmica, estiveram do meu lado e me deram total suporte para que eu chegasse até aqui. Sou imensamente grata pelo carinho, pelos conselhos e pela compreensão nos momentos de ausência. Agradeço também a minha irmã Maria Clara pela companhia e pelo cuidado quando a correria me tomava por inteira, sou grata por sua vinda à Londrina e pela nossa aproximação. Amo vocês.

Também deixo um agradecimento especial ao meu namorado João Otávio por todo o apoio depositado, por estar ao meu lado sempre e por me salvar com as inúmeras revisões do inglês. Não tenho palavras suficientes para agradecer o enorme suporte que você me dá, sinto seu carinho e acolhimento mesmo distantes e sou grata por tê-lo como companheiro de vida. Te amo.

Agradeço a Deus por este caminho trilhado, por me fortalecer nos momentos de angústia e por me iluminar nesta jornada. Assim encerro um dos ciclos que Ele preparou para mim.

TERRA, Mariana Costa. **Genômica populacional de *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica.** 2023. 118 p. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora, Londrina.

RESUMO

As aranhas constituem um dos mais diversos grupos de animais e estão amplamente distribuídas pelo planeta. Ctenidae é uma das grandes famílias existentes, com representantes ocorrendo na região Tropical. Dentre os ctenídeos, *Enoploctenus cyclothorax* é caracterizado por hábitos arborícolas e cavernícolas, com distribuição restrita às florestas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil. A Mata Atlântica, assim como outras florestas tropicais, é caracterizada como um ecossistema rico em biodiversidade que, atualmente, encontra-se seriamente fragmentada. A fragmentação de habitats está entre as maiores ameaças responsáveis pela diminuição populacional das aranhas, impactando significativamente a araneofauna presente nas florestas. Por este motivo, as Unidades de Conservação são tão importantes para a preservação da diversidade biológica. No presente trabalho foi avaliada a genética populacional de *E. cyclothorax* em seis fragmentos de Mata Atlântica no Paraná, protegidos por Unidades de Conservação do estado. As estimativas foram realizadas a nível genômico, baseadas na genotipagem de 3.319 SNPs. Os resultados obtidos suportam a separação de *E. cyclothorax* em dois grupos genéticos distintos, baseados principalmente em análises de estruturação genética e fluxo gênico. Forte e significativa estrutura genética foi observada nas populações analisadas, apoiada pelo $k = 3$ estimado pela análise *bayesiana*, e também pelo elevado valor de F_{ST} identificado pela Análise de Variância Molecular ($F_{ST} = 0,70$). Essa forte estruturação genética indica possível isolamento dos grupos genéticos identificados, suportada pelo baixo fluxo gênico entre eles. Foi constatado uma barreira genética entre os grupos e correspondência positiva entre as diferenças genéticas e geográficas das populações, evidenciando isolamento por distância. Por fim, a análise genômica populacional também revelou uma diversidade genética não homogênea em *E. cyclothorax* ($H_E = 0,14$ a $0,31$). Partindo da hipótese de que tais grupos genéticos representem unidades evolutivas distintas, uma delimitação de espécies foi realizada a partir do DNA *barcoding*, confirmando por meio de análises combinadas do mtDNA que duas linhagens distintas estão presentes no atual conjunto de dados. Essas análises evidenciaram alta distância genética entre as linhagens (12,94%) e dois haplogrupos principais correspondentes aos dois clados da árvore de coalescência, revelando diversidade críptica na espécie. Na árvore datada as duas linhagens se coalescem há aproximadamente 1 milhão e 200 mil anos atrás, o que relacionaria a divergência entre elas com as oscilações climáticas do Quaternário, mais especificamente do Pleistoceno. O presente estudo traz os primeiros dados genéticos populacionais para *E. cyclothorax* e reforça a necessidade de uma revisão minuciosa na espécie, que se mostrou vulnerável à fragmentação populacional.

Palavras-chave: aranhas; DNA *barcoding*; estrutura genética; diversidade críptica; Filogeografia; SNPs.

TERRA, Mariana Costa. **Population genomics of *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae) in Atlantic Forest forest fragments**. 2023. 118 p. Doctoral thesis presented to the Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, State University of Londrina, as a requirement for obtaining the title of Doctor, Londrina.

ABSTRACT

Spiders are one of the most diverse groups of animals and are widely distributed across the planet. Ctenidae is one of the large existing families, with representatives occurring in the Tropical region. Among the ctenids, *Enoploctenus cyclothorax* is characterized by arboreal and cavernous habits, with distribution restricted to the Atlantic Forest of the South and Southeast regions of Brazil. The Atlantic Forest, like other tropical forests, is characterized as an ecosystem rich in biodiversity that, at the moment, is seriously fragmented. Habitat fragmentation is among the biggest threats responsible for the population decrease of spiders, significantly impacting the araneofauna present in forests. For this reason, Conservation Units are so important for the preservation of biological diversity. In the present work, the population genetics of *E. cyclothorax* was evaluated in six Atlantic Forest fragments in Paraná, protected by Conservation Units in the state. Estimates were performed at the genomic level, based on the genotyping of 3.319 SNPs. The results obtained support the separation of *E. cyclothorax* into two distinct genetic groups, based mainly on analysis of the genetic structure and gene flow. Strong and significant genetic structure was observed in the analyzed populations, supported by the $k = 3$ estimated by the Bayesian analysis, and also by the high F_{ST} value identified by the Molecular Variance Analysis ($F_{ST} = 0.70$). This strong genetic structure indicates possible isolation of the identified genetic groups, supported by the low gene flow between them. A genetic barrier was found between the groups and a positive correspondence between the genetic and geographic differences of the populations, evidencing isolation by distance. The population genomic analysis also revealed a non-homogeneous genetic diversity in *E. cyclothorax* ($HE = 0.14$ a 0.31). Assuming that such genetic groups represent distinct evolutionary units, a species delimitation was carried out using DNA barcoding, confirming through combined mtDNA analyses that two distinct lineages are present in the current data set. These analyses showed high genetic distance between the lineages (12.94%) and two main haplogroups corresponding to the two clades of the coalescence tree, revealing cryptic diversity in the species. In the dated tree, the two lineages coalesce approximately 1 million and 200 thousand years ago, which would relate the divergence between them to the Quaternary climate oscillations, more specifically the Pleistocene. The present study brings the first population genetic data for *E. cyclothorax* and reinforces the need for a thorough review of the species, which proved to be vulnerable to population fragmentation.

Key-words: spiders; DNA *barcoding*; genetic structure; cryptic diversity; Phylogeography; SNPs.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Sinapomorfias compartilhadas pela Ordem Araneae. Em **a** as fiandeiras localizadas na porção terminal do abdômen, com fios de seda aparentes. Em **b** o pedipalpo modificado de um macho adulto (*Heteropoda tetrica* Thorell, 1897), onde observa-se uma estrutura translúcida (bulbo do palpo) expandida para transferência do esperma..... 26
- Figura 2** – Morfologia externa geral de uma aranha. Em **a** vista dorsal de um macho e em **b** vista ventral de uma fêmea. Destaque para as estruturas fixadas no cefalotórax: os pares de pernas (*leg*), o par de quelíceras (*chelicera*) e de pedipalpos (*pedipalp/palp*). As fiandeiras (*spinnerets*) estão presentes no abdômen de ambos os sexos, já o epígino (*epigynum*) só pode ser observado no abdômen das fêmeas (b). Neste esquema, comparando os pedipalpos do macho (a) e da fêmea (b) podemos observar a modificação da porção final nos machos em órgãos copulatórios. 28
- Figura 3** – Morfologia interna de uma aranha representada de forma simplificada, onde à esquerda vemos órgãos presentes no prossoma (cefalotórax), e à direita órgãos presentes no opistossoma (abdômen)..... 29
- Figura 4** – Número de espécies atualmente válidas descritas por ano, representado pelos círculos azuis..... 30
- Figura 5** – Esquema demonstrando a posição das presas das quelíceras em aranhas da infraordem Mygalomorphae (**a**) e da infraordem Araneomorphae (**b**). Em **a** alinhamento paralelo das quelíceras ortognatas, já em **b** quelíceras labdognatas opostas entre si. 31
- Figura 6** – Esquema representando um cladograma simplificado da ordem Araneae, demonstrando as relações filogenéticas dentro do grupo das aranhas e os principais caracteres que os distinguem.
Mesothelae: aranhas da família Liphistiidae, **Mygalomorphae:**

	clado das tarântulas e Araneomorphae : clado das aranhas “verdadeiras” que representam 90% de todas as espécies existentes.....	32
Figura 7 –	Importante caráter descritivo de Ctenidae: disposição dos oito olhos em três fileiras, representado pelo arranjo ocular do tipo 2-4-2. A esquerda esquema retirado de Jocqué e Dippenaar-Schoeman (2006) e a direita foto da espécie <i>Enoploctenus cyclothorax</i>	34
Figura 8 –	Filogenia datada da família Lycosidae e dos grupos mais próximos a ela. Círculos vermelhos representam probabilidades posteriores iguais ou superiores a 0,95. Nesta árvore observa-se Ctenidae mais próximo das famílias Psechridae e Oxyopidae.	37
Figura 9 –	Exemplares de <i>Enoploctenus cyclothorax</i> , objeto de estudo do presente trabalho. A esquerda exemplar já armazenado em álcool 70%, fotografado no laboratório e a direita exemplar fotografado no local de coleta.	40
Figura 10 –	Mapa de distribuição geográfica de exemplares de <i>Enoploctenus cyclothorax</i> no Brasil, América do Sul.	40
Figura 11 –	Esquema representando a geologia e o relevo do estado do Paraná. Destaque para as Escarpas Serra do Mar (SM), Devoniana (ED) e Serra Geral (SG). Cidades destacadas: Paranaguá (PAR), Curitiba (CTB), Ponta Grossa (PGR) e Guarapuava (GUA). Legenda: 1: sedimentos cenozóicos da Planície Costeira e Plataforma Continental; 2: sedimentos cenozóicos da Bacia de Curitiba; 3: Grupos Bauru e Caiuá (Cretáceo); 4: Bacia de Santos; 5: derrames de basalto da Formação Serra Geral; 6: unidades paleozóicas e mesozóicas da Bacia do Paraná; 7: Formação Furnas; 8: embasamento pré-cambriano.	49

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Localidades de coleta de *E. cyclothorax*, amostrados em Unidades de Conservação do estado do Paraná, Brasil, América

do Sul (círculos pretos). Destaque para os remanescentes florestais de Mata Atlântica (ênfase em fragmentos de mata), apresentado pela Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (2020-2021). Mapa desenvolvido no programa QGIS v.3.16.16 (escala 1:250.000) e finalizado no programa Adobe Photoshop 2021. 65

Figura 2 – Agrupamento *bayesiano* resultante do programa Structure, evidenciando três grupos genéticos (*clusters*) que representam as seis populações de *E. cyclothorax* ao longo estado do Paraná (K = 3). As populações GOD, RIO e REB encontram-se na região fitogeográfica Floresta Estacional Semidecidual, enquanto GUA, VIL e REB encontram-se nas Florestas Ombrófila Mista, Campos Gerais e Ombrófila Densa, consecutivamente. Em azul, barreira genética detectada pelo programa Barrier (*bootstrapping* = 1). Observe que a constituição genética dos indivíduos pertencentes as populações do Norte e Oeste (GOD, RIO e REB) é distinta dos indivíduos pertencentes as populações do Leste (GUA, VIL e MAT), com pouca mistura entre esses dois grandes grupos. Esta forte estruturação genética identificada indica baixo fluxo gênico entre os grupos. Imagem finalizada no programa Adobe Photoshop 2021. 71

Figura 3 – Mapa de calor com a representação gráfica dos coeficientes de diferenciação par a par (F_{ST}) gerado no programa Arlequin. Quanto mais claro o tom de azul, menor é a divergência genética entre as populações comparadas, e quanto mais forte o tom de azul, maior é a divergência genética entre as diferentes populações comparadas. Em branco, não há diferenciação genética, uma vez que a população está sendo comparada com ela mesma..... 72

Figura 4 – Rede de conectividade baseada na matriz de distância genética (F_{ST} par a par) gerada no programa Arlequin, e na matriz de distância geográfica (coordenadas geográficas). Nesta rede, as populações são conectadas por *links* (linhas) que representam a distância genética entre elas. Desta forma, quanto mais espesso for o *link*, menor é a distância genética entre as populações. Os

	círculos vermelhos representam as populações com os maiores valores de Centralidade de Intermediação, e a relação das cores dos <i>links</i> foi determinada aleatoriamente pelo programa.	74
Figura S1	– Número de grupos genéticos (<i>clusters</i>) mais provável, evidenciado pelo método de <i>Puechmaille</i> (2016) por meio da ferramenta online Structure Selector, que revelou um número mais provável de $K = 3$ para os <i>loci</i> avaliados.	89
Figura S2	– Gráfico sumarizado das simulações realizadas no programa Structure. Para um $K = 3$, das 20 simulações que foram feitas obteve-se 20 simulações convergentes, havendo 100% de concordância nos agrupamentos e uma estabilidade na análise.	90

CAPÍTULO 2

Figura 1	– Área de estudo e relações entre os haplótipos obtidos para as sequências do gene COI. (a) Mapa da América do Sul evidenciando o estado do Paraná, Brasil, região de estudo do presente trabalho. (b) Rede de haplótipos com nove haplótipos identificados. Cada nó (círculo) representa um haplótipo, que são conectados por ramos de diferentes comprimentos, dependendo do número de passos mutacionais (nucleotídeos que diferem entre os haplótipos, representados em vermelho). O tamanho dos nós são proporcionais às frequências dos haplótipos. (c) Distribuição geográfica dos haplótipos, com gráficos de pizza adjuntos aos pontos de amostragem de <i>E. cyclothorax</i> . Em (b) e (c) as cores frias representam populações do norte e oeste, enquanto as cores quentes representam populações do leste	101
Figura 2	– Árvore de coalescência evidenciando as relações filogenéticas entre os espécimes de <i>Enoploctenus cyclothorax</i> . Nos ramos, a cima temos a idade dos nós e a baixo a probabilidade a posteriori. O intervalo de credibilidade (HPD) de 95% é representado pelas barras azuis horizontais. O primeiro clado (em roxo) agrupa os espécimes da linhagem 1, que são encontrados exclusivamente nas populações do leste. Já o	

segundo clado (em azul escuro e azul claro) agrupa os espécimes da linhagem 2, que são encontrados majoritariamente nas populações do norte e oeste. Por fim, o tempo de divergência é em milhões de anos (Ma)..... 102

Figura 3 – Reconstrução da história demográfica ao longo do tempo para o gene COI em populações de *E. cyclothorax*, a partir da análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP), com base em informações extraídas da árvore de coalescência. No gráfico a linha tracejada indica uma estabilidade das populações ao longo do tempo, e uma leve expansão populacional há aproximadamente 50 mil anos até o presente 103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Caracterização dos locais de coleta e das populações de *E. cyclothorax*, amostradas em Unidades de Conservação no estado do Paraná, Brasil. 66
- Tabela 2** – Caracterização das Unidades de Conservação avaliadas no presente trabalho, considerando tamanho de área, relevo e vegetação..... 67
- Tabela 3** – Estimativas de diversidade genômica encontradas em populações de *E. cyclothorax* coletadas em Unidades de Conservação ao longo do estado do Paraná. Os índices de diversidade são mostrados apenas para *loci* polimórficos 70
- Tabela 4** – Valores de F_{ST} entre pares de populações de *E. cyclothorax* 73
- Tabela S1** – Relação dos espécimes utilizados nas análises genômicas populacionais, com seus respectivos números de tombo, localidade, sexo e estágio 85
- Tabela S2** – Indivíduos retirados das análises populacionais devido a quantidade extremamente baixa de leituras brutas retidas em relação as outras amostras 87
- Tabela S3** – Polimorfismos identificados no conjunto de dados de *Enoploctenus cyclothorax* 88
- Tabela S4** – Resultados dos testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e do *U-test*, usando 10.000 iterações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) 88

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Caracterização das populações de *Enoploctenus cyclothorax* amostradas em UCs no estado do Paraná, Brasil 96
- Tabela 2** – Distâncias genéticas interpopulacionais observadas em *E. cyclothorax* baseado no modelo de evolução Tamura e Nei (1993). Em azul, valores do desvio padrão 99
- Tabela 3** – Distâncias genéticas intrapopulacionais observadas em *E. cyclothorax* baseado no modelo de evolução Tamura e Nei

(1993).....	99
Tabela 4 – Valores de F_{ST} entre pares de populações de <i>Enoploctenus cyclothorax</i> (<i>pairwise</i> F_{ST})	100
Tabela S1 – Relação dos espécimes utilizados nas análises genômicas populacionais, com seus respectivos números de tombo, localidade, sexo e estágio	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de Fragmentos Restringidos Amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
AMOVA	Análise de Variância Molecular (<i>Analysis of Molecular Variance</i>)
A_P	Alelo privado
Biol	Biológica
COD	Código de identificação da população
COI	Citocromo C Oxidase I (<i>Cytochromo C Oxidase Subunit 1</i>)
d	Diversidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d.p.	Desvio padrão
EBSP	<i>Extended Bayesian Skyline Plot</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
Est	Estadual
FES	Floresta Estacional Semidecidual
Fig	Figura
F_{IS}	Coeficiente de endogamia
F_{IT}	Varição genética dentro de indivíduos
FOD	Floresta Ombrófila Densa

FOM	Floresta Ombrófila Mista
F_{ST}	Variação genética entre populações
g	Grama
GBS	Genotipagem por sequenciamento (<i>Genotyping by sequencing</i>)
GOD	Parque Estadual Mata dos Godoy
GUA	Parque Estadual do Guartelá
H	Haplótipo
H_O	Heterozigosidade observada
H_E	Heterozigosidade esperada
H ₂ O	Água
ID	Identificação do indivíduo
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ITS2	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LaCEM	Laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular
LAT	Latitude
LONG	Longitude
M	Molar
MAT	Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange
MCMC	Cadeias de Markov e Monte-Carlo (<i>Markov Chain Monte-Carlo</i>)
mg	Micrograma

mL	Mililitro
mtDNA	DNA mitocondrial
N	Número de indivíduos genotipados
Nac	Nacional
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
N_{LP}	Número de <i>loci</i> polimórficos
ONG	Organização não governamental
Parq	Parque
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pop	População
<i>Pst</i> I	Enzima de restrição <i>Pst</i> I
RAD-Seq	Sequenciamento de DNA Associado a sítios de Restrição (<i>Restriction site associated DNA sequencing</i>)
RAPD	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>)
REB	Reserva Biológica das Perobas
Res	Reserva

RIO	Parque Estadual Rio Guarani
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
s.d.	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSR	Microssatélite (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
Tab	Tabela
Tris-HCl	Cloridrato de Tris (<i>TRIS hydrochloride</i>)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UCs	Unidades de Conservação
μl	Microlitro
VIL	Parque Estadual de Vila Velha
°C	Escala Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	Caracterização geral da ordem Araneae	25
2.1.1	Aspectos morfológicos.....	25
2.1.2	Aspectos taxonômicos.....	29
2.2	Família Ctenidae	33
2.2.1	Aspectos biológicos.....	33
2.2.2	Considerações sistemáticas.....	36
2.2.3	Contextualização do gênero <i>Enoploctenus</i> e da espécie <i>E. cyclothorax</i>	38
2.3	Genômica populacional	41
2.4	Marcadores moleculares: ênfase SNPs e COI	42
2.5	Aspectos gerais de estudos genético-populacionais em aranhas	44
2.6	Fragmentação das florestas e o impacto nas populações naturais	45
2.7	Conservação florestal no Estado do Paraná	46
2.8	Relevo e fitofisionomia do Paraná	48
3	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	51
4	BIBLIOGRAFIA	52
5	CAPÍTULO 1	61
	Dados genômicos identificam forte estruturação genética em <i>Enoploctenus cyclothorax</i> (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae), revelando duas unidades taxonômicas distintas na região sul da Mata Atlântica brasileira	
5.1	Introdução	64
5.2	Material e métodos	65
5.2.1	Amostragem	65

5.2.2	Caracterização das unidades de conservação.....	66
5.2.3	Extração de DNA, preparação e sequenciamento das bibliotecas genômicas.....	67
5.2.4	Processamento dos dados.....	67
5.2.5	Análise de diversidade genética.....	68
5.2.6	Análise de estrutura genética e conectividade.....	68
5.3	Resultados	69
5.3.1	Identificação de SNPs.....	69
5.3.2	Diversidade genética.....	69
5.3.3	Estrutura genética e fluxo gênico.....	70
5.4	Discussão	74
5.5	Bibliografia	78
6	CAPÍTULO 2	91
	Diversidade críptica em <i>Enoploctenus cyclothorax</i> (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae) identificada por DNA <i>barcoding</i>	
6.1	Introdução	94
6.2	Material e métodos	95
6.2.1	Amostragem e área de estudo.....	95
6.2.2	Extração de DNA e amplificação do gene COI.....	96
6.2.3	Análise dos dados.....	97
6.3	Resultados	98
6.3.1	Distância genética.....	98
6.3.2	Estrutura genética.....	100
6.3.3	Filogeografia e história demográfica.....	101
6.4	Discussão	103
6.5	Bibliografia	108
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	117

1 1 INTRODUÇÃO

2 A Mata atlântica, assim como outras florestas tropicais, é
3 caracterizada como um ecossistema rico em biodiversidade, que apresenta altos
4 níveis de endemismo e de ameaça. Por este motivo, o bioma é considerado um dos
5 35 *hotspot* de biodiversidade existentes no planeta, e como uma região seriamente
6 degradada é, portanto, prioritária para conservação (RIBEIRO *et al.*, 2009). Dentre os
7 aracnídeos, as aranhas (Araneae) constituem um grupo extremamente diverso,
8 presente em praticamente todos os ambientes terrestres (PLATNICK *et al.*, 2020),
9 inclusive na Mata Atlântica, exercendo um importante papel ecológico no controle
10 populacional de insetos e outras presas (VANKHEDE, HADOLE e CHAKRAVARTHY,
11 2016; PLATNICK, 2020). Vários estudos têm demonstrado que a fragmentação do
12 habitat impacta diretamente a araneofauna presente nas florestas, levando a uma
13 diminuição da riqueza e da abundância de espécies (REGO, VENTICINQUE e
14 BRESCOVIT, 2005, 2007; STEFANI e DEL-CLARO, 2015; VANKHEDE, HADOLE e
15 CHAKRAVARTHY, 2016; BOAS JUNIOR, FERREIRA e SOUZA, 2020).

16 Dentre os 17 estados que compreendem a Mata Atlântica brasileira,
17 o Paraná vem se mantendo em terceiro lugar no ranking do desmatamento nos últimos
18 anos, comprometendo significativamente a conectividade e a conservação de
19 fragmentos florestais (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2021;
20 FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2022). Alguns destes fragmentos
21 encontram-se protegidos na forma de Unidades de Conservação (UCs), que
22 desempenham um importante papel na preservação da biodiversidade e dos recursos
23 genéticos (WWF/UNIDADES DE CONSERVAÇÃO: CONSERVANDO A VIDA, OS
24 BENS E OS SERVIÇOS AMBIENTAIS, 2008).

25 Além do desmatamento, outras variáveis ambientais também podem
26 interferir na distribuição da variabilidade genética das espécies, como por exemplo,
27 relevo e fitofisionomia. Diferentes tipos de vegetações naturais compõem o estado do
28 Paraná, bem como planaltos escalonados e escarpas que, naturalmente, comportam-
29 se como obstáculos naturais (MELO, MORO e GUIMARÃES, 2007; MELO *et al.*, 2007;
30 WREGGE *et al.*, 2017). Esta variação de paisagens confere um mosaico de habitats
31 heterogêneo ao estado e, conseqüentemente, as populações acabam se adaptando
32 aos microambientes que existem.

33 Apesar das aranhas constituírem um grupo diverso, com mais de 50

1 mil espécies válidas (WORLD SPIDER CATALOG, 2023), os estudos genéticos
2 populacionais ainda são bastante limitados, desta forma pouco se sabe sobre o
3 impacto da fragmentação populacional sobre a conservação das espécies.

4 Sendo assim, este trabalho teve o intuito de caracterizar a diversidade
5 e a estrutura genética de populações de *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880)
6 amostradas em Unidades de Conservação ao longo do estado do Paraná, a fim de
7 compreender quais os prováveis fatores que estão envolvidos no atual padrão de
8 variabilidade genética observado. Este é um dos primeiros trabalhos genético
9 populacionais em escala genômica realizado na ordem, e o primeiro aplicado à família
10 Ctenidae, que traz importantes implicações para a conservação de *E. cyclothorax*.

1 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 As aranhas estão amplamente distribuídas pelo planeta, ocupando
3 diferentes ecossistemas terrestres. Com exceção da Antártica, elas podem ser
4 encontradas desde cavernas em grandes ou pequenas altitudes até regiões
5 desérticas e de tundra (PLATNICK *et al.*, 2020).

6 Estes organismos constituem um dos grupos de animais mais
7 diversos que existem, com uma riqueza de espécies superior à de grupos como
8 peixes, aves e mamíferos (WORLD SPIDER CATALOG, 2023; ESCHMEYER'S
9 CATALOG OF FISHES, 2023; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2023; MAMMAL
10 DIVERSITY DATABASE, 2023). Porém, apesar de constituir um grupo muito diverso,
11 poucos são os trabalhos genético populacionais voltados para estes invertebrados.

12 2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ORDEM ARANEAE

13 2.1.1 Aspectos Morfológicos

14 As aranhas (Ordem Araneae) pertencem ao Filo Arthropoda, o maior
15 filo do reino animal (McGAVIN, 2009). Os artrópodes são subdivididos em insetos,
16 crustáceos, miriápodes e quelicerados, caracterizados por apresentarem
17 exoesqueleto (esqueleto externo bastante resistente composto por quitina), corpos
18 segmentados e apêndices articulados (PLATNICK, 2020).

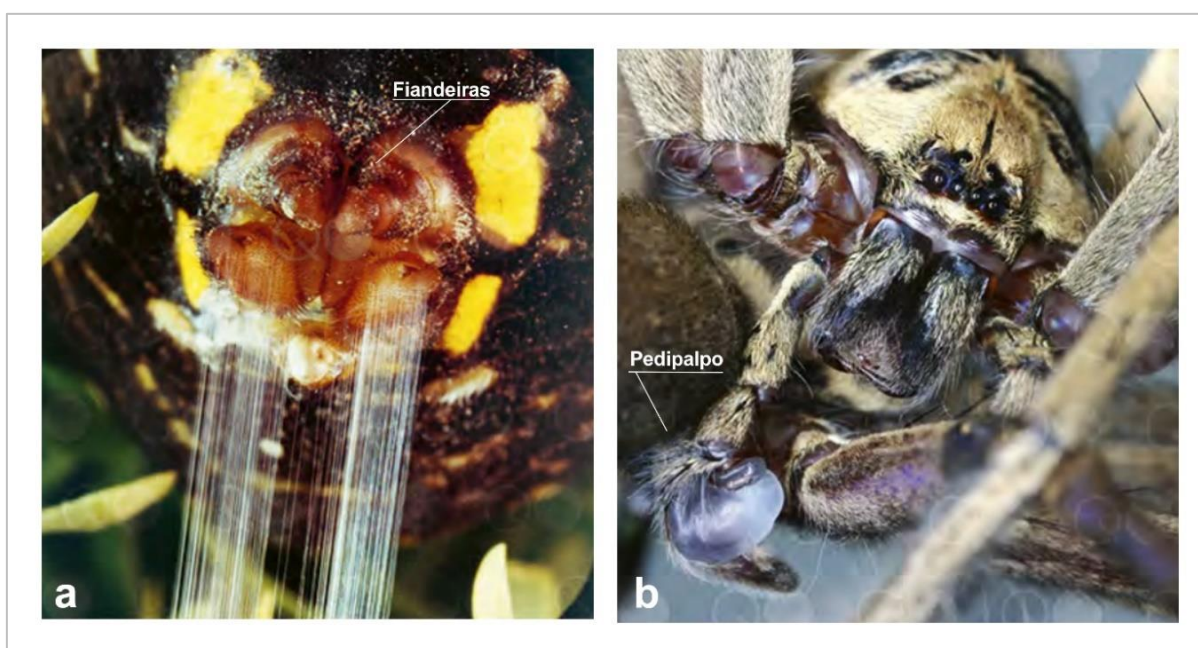
19 Apesar de frequentemente confundidas com insetos por leigos, as
20 aranhas pertencem ao subgrupo dos quelicerados, composto principalmente pelos
21 seguintes aracnídeos: aranhas, escorpiões, opiliões e ácaros (PLATNICK, 2020). Os
22 aracnídeos (Classe Arachnida) são caracterizados por apresentarem a cabeça e o
23 tórax fundidos em um único segmento, denominado cefalotórax (ou prossoma) que,
24 junto com o abdômen (ou opistossoma) compõem duas regiões corporais principais,
25 conectados por uma estrutura estreita conhecida como pedicelo (FOELIX, 2011;
26 PLATNICK, 2020). Além disso, também exibem quatro pares de pernas articuladas e
27 dois pares de apêndices bucais articulados, conhecidos como pedipalpos e quelíceras
28 (McGAVIN, 2009; PLATNICK, 2020).

29 Duas sinapomorfias são compartilhadas por todos os representantes
30 da ordem das aranhas, caracteres estes não encontrados em outros seres vivos. A

1 primeira delas são as fiandeiras (**Figura 1a**), apêndices localizados na porção terminal
2 do abdômen, responsáveis por fiar a seda produzida pelas glândulas de seda
3 abdominais. Apesar de todas as espécies de aranhas produzirem seda, estima-se que
4 apenas metade delas as utilizam na captura de presas (WHEELER *et al.*, 2016;
5 PLATNICK, 2020).

6 Ainda de acordo com Wheeler *et al.* (2016) e Platnick (2020), a
7 segunda sinapomorfia são os pedipalpos modificados observados nos machos
8 adultos, que funcionam como órgãos copulatórios durante o acasalamento, utilizados
9 na transferência do esperma até a genitália das fêmeas (**Figura 1b**). No geral os
10 pedipalpos também são utilizados na captura e manipulação de suas presas.

Figura 1 Sinapomorfias compartilhadas pela Ordem Araneae. Em **a** as fiandeiras localizadas na porção terminal do abdômen, com fios de seda aparentes. Em **b** o pedipalpo modificado de um macho adulto (*Heteropoda tetrica* Thorell, 1897), onde observa-se uma estrutura translúcida (bulbo do palpo) expandida para transferência do esperma.



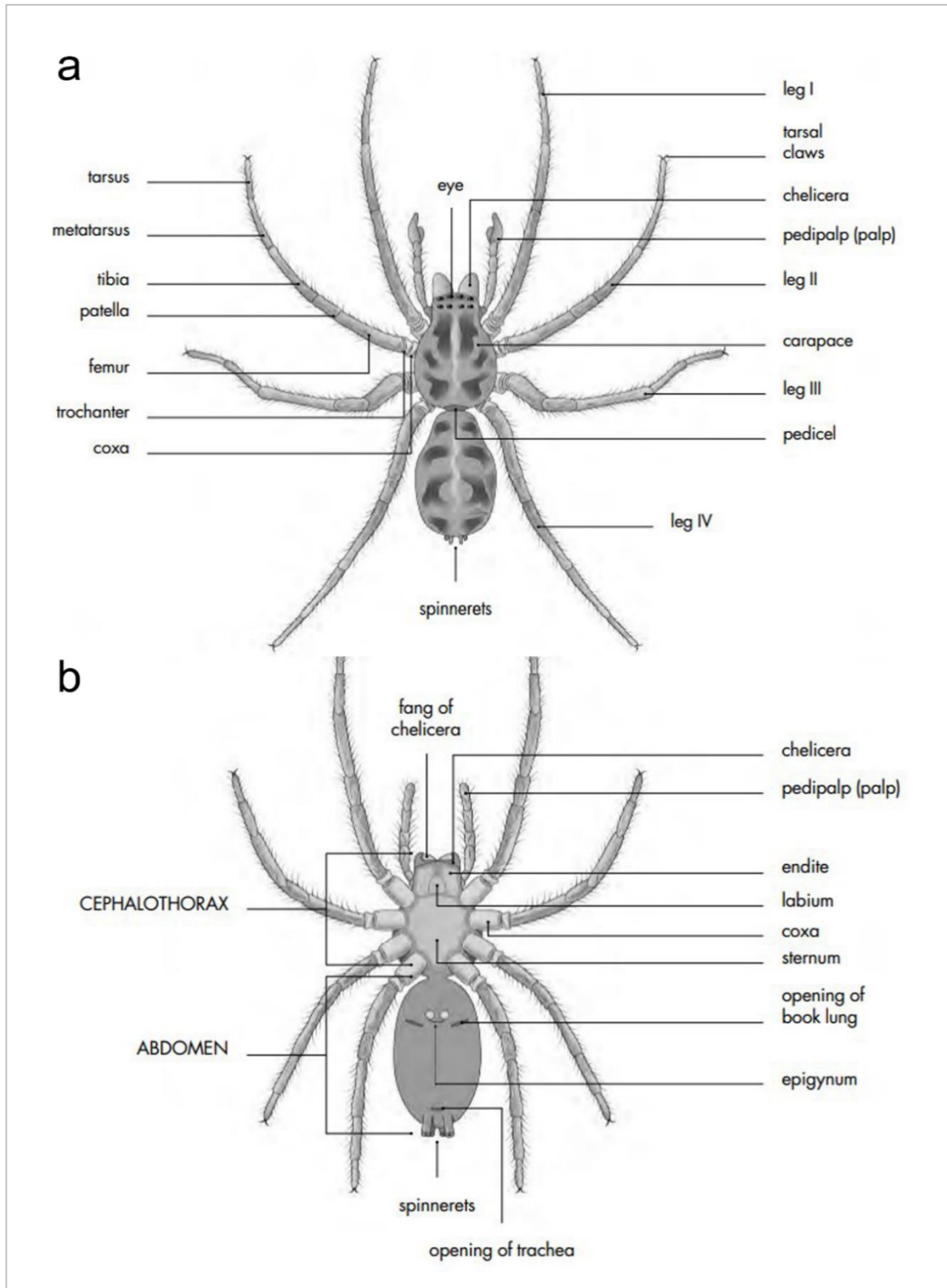
Fonte: Imagens retiradas de Platnick (2020).

11 Duas placas rígidas recobrem o prossoma, uma dorsal e uma ventral
12 chamadas de carapaça e esterno, respectivamente. É neste segmento onde são
13 fixados um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas
14 (FOELIX, 2011), e onde também são encontrados os olhos (geralmente 8 olhos
15 simples, dispostos em padrões específicos em cada família), a boca e o sistema
16 nervoso central (**Figura 2a**). Desta forma as principais funções do prossoma estão

1 relacionados a locomoção, absorção de alimentos e integração nervosa (FOELIX,
2 2011; PLATNICK, 2020).

3 O opistossoma é um segmento mais macio, em formato de saco, que
4 carrega em sua morfologia externa as fiandeiras (geralmente seis fiandeiras, embora
5 esse número possa variar dentro da ordem) e o epígino, órgão reprodutor das fêmeas
6 **(Figura 2b)** (FOELIX, 2011; PLATNICK, 2020). De acordo com Foelix (2011), o
7 opistossoma é principalmente responsável pelas tarefas vegetativas relacionadas a
8 digestão, circulação, respiração, excreção, reprodução e produção de seda.

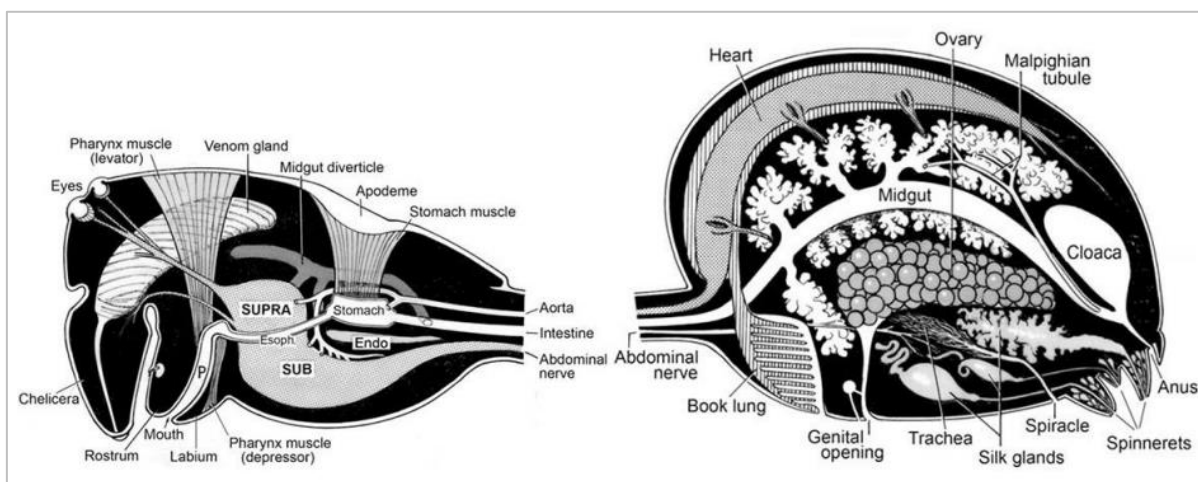
Figura 2 Morfologia externa geral de uma aranha. Em **a** vista dorsal de um macho e em **b** vista ventral de uma fêmea. Destaque para as estruturas fixadas no cefalotórax: os pares de pernas (*leg*), o par de queléceras (*chelicera*) e de pedipalpos (*pedipalp/palp*). As fiandeiras (*spinnerets*) estão presentes no abdômen de ambos os sexos, já o epígino (*epigynum*) só pode ser observado no abdômen das fêmeas (**b**). Neste esquema, comparando os pedipalpos do macho (**a**) e da fêmea (**b**) podemos observar a modificação da porção final nos machos em órgãos copulatórios.



Fonte: Imagem retirada de Platnick (2020).

1 Na **Figura 3** temos uma visão geral dos órgãos internos das aranhas,
 2 onde músculos fortes conectam a carapaça e o esterno do prossoma (PLATNICK,
 3 2020). Além disto, encontram-se dentro deste segmento um par de glândulas de
 4 veneno, o sistema nervoso central, parte do trato intestinal, a faringe e o estômago.
 5 Já no opistossoma encontram-se o restante do trato intestinal, o coração, as artérias
 6 abdominais, túbulos de malpighi, pulmão e traqueia, gônada e as glândulas de seda
 7 (FOELIX, 2011). Todos estes órgãos internos são envoltos pela hemolinfa
 8 (PLATNICK, 2020).

Figura 3 Morfologia interna de uma aranha representada de forma simplificada, onde à esquerda vemos órgãos presentes no prossoma (cefalotórax), e à direita órgãos presentes no opistossoma (abdômen).



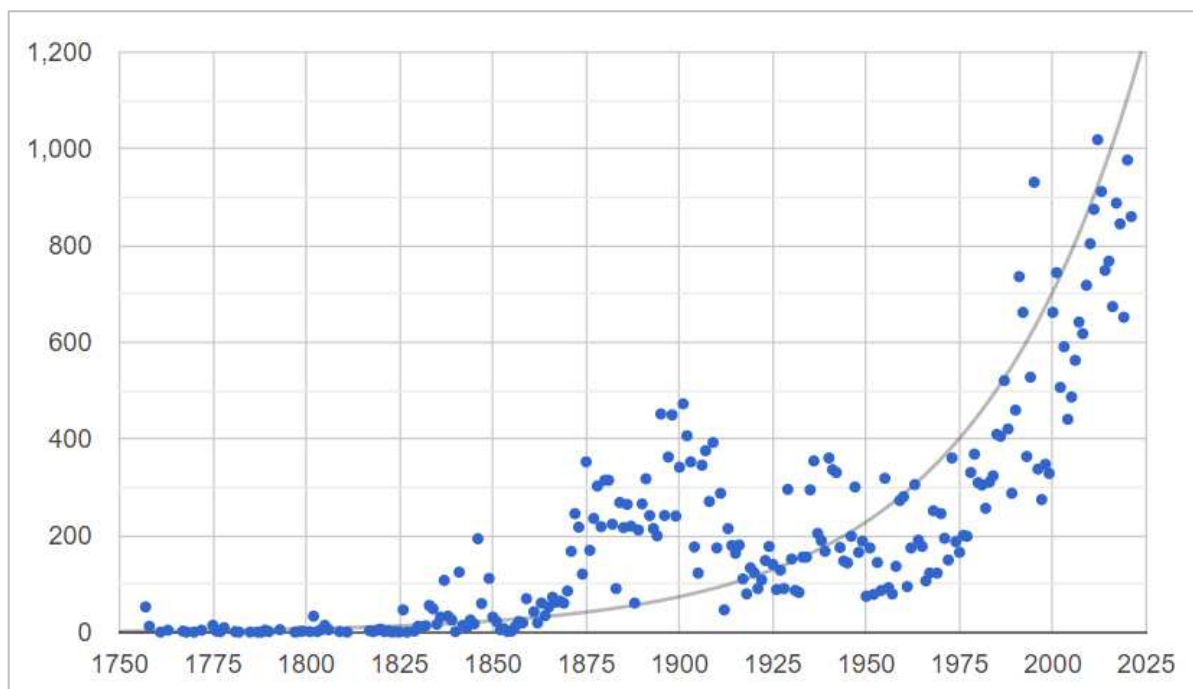
Fonte: Imagens retiradas de Foelix (2011).

9 2.1.2 Aspectos Taxonômicos

10 Atualmente a ordem Araneae é composta por 50.626 espécies
 11 descritas, que se encontram distribuídas em 4.290 gêneros e 132 famílias (WORLD
 12 SPIDER CATALOG, 2023). Mesmo com essa riqueza de espécies validadas, acredita-
 13 se que a real diversidade do grupo está longe de ser compreendida, havendo
 14 necessidade de muitas descrições de novas espécies, como levantado por Santos,
 15 Brescovit e Japyassú (2007) e Brescovit, Oliveira e Santos (2011). Atualmente, o
 16 número de espécies válidas descritas por ano gira em torno de 1.000 espécies,
 17 número este que continua aumentando em curva exponencial (WORLD SPIDER
 18 CATALOG, 2023), e reforça a forte evidência de que ainda há muitas espécies a

1 serem descritas (**Figura 4**).

Figura 4 Número de espécies atualmente válidas descritas por ano, representado pelos círculos azuis.



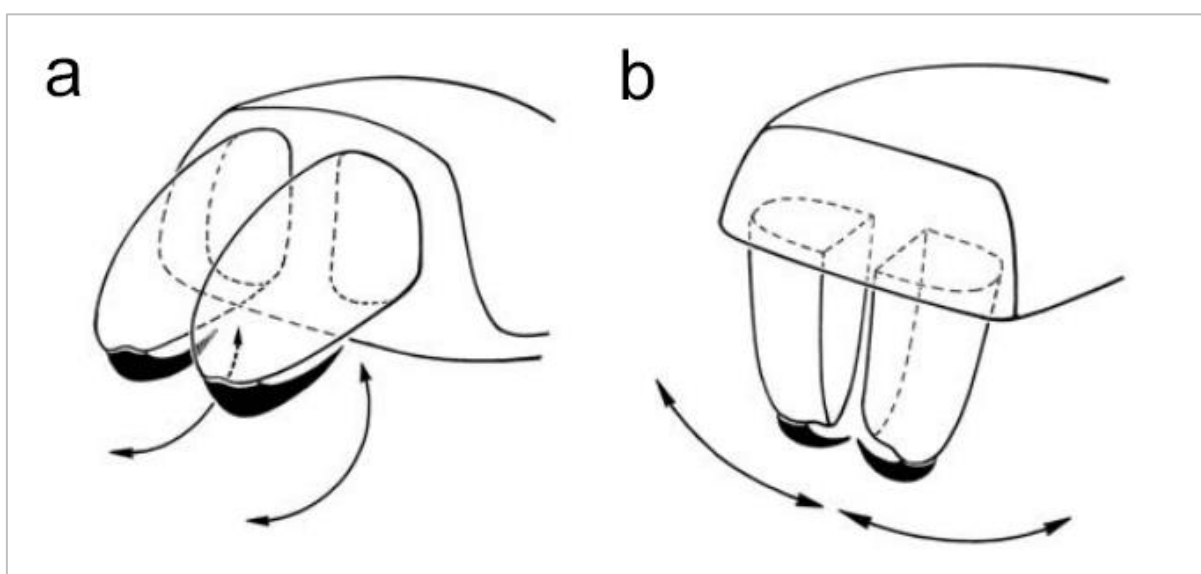
Fonte: Imagem retirada de World Spider Catalog (2023).

2 As aranhas são divididas em duas subordens, Mesothelae composta
 3 apenas pela família Liphistiidae, e Opisthothelae que abrange todas as outras famílias
 4 de aranhas existentes. Os liphistídeos apresentam abdômen segmentado, oito
 5 fiandeiras posicionadas próximas a porção mediana do abdômen (por isso “meso-
 6 thele”), 4 pulmões e quelíceras com presas ortognatas (disposição paralela). A
 7 segunda subordem é Opisthothelae, cujos representantes não apresentam abdômen
 8 segmentado, tais segmentos foram suprimidos ao longo do processo evolutivo deste
 9 grupo, com isso as fiandeiras localizam-se próximos ao ápice do abdômen (por isso
 10 “opistho-thele”). Ambas as subordens são monofiléticas com forte valor de suporte
 11 (FOELIX, 2011; WHEELER *et al.*, 2016; PLATNICK, 2020).

12 Opisthothelae ainda é subdividido em duas infraordens.
 13 Mygalomorphae, que compreende as espécies de caranguejeiras caracterizadas pela
 14 disposição paralela das quelíceras (quelíceras ortognatas, que se movem para cima
 15 e para baixo), e Araneomorphae, que compreende as aranhas “verdadeiras”
 16 caracterizadas por quelíceras opostas uma à outra (quelíceras labdognatas que se
 17 movem de um lado para o outro) (**Figura 5**). Outros caracteres também são

1 importantes para a caracterização taxonômica dessas infraordens, como por exemplo
 2 o par mediano anterior de fiandeiras presente nas Mesothelae, que é fusionado ou
 3 reduzido em um cribelo ou colulun em algumas Araneomorphae e totalmente ausente
 4 nas Mygalomorphae. Outro exemplo são as glândulas de seda periformes, uma
 5 sinapomorfia de Araneomorphae (FOELIX, 2011; WHEELER *et al.*, 2016; PLATNICK,
 6 2020).

Figura 5 Esquema demonstrando a posição das presas das quelíceras em aranhas da infraordem Mygalomorphae (**a**) e da infraordem Araneomorphae (**b**). Em **a** alinhamento paralelo das quelíceras ortognatas, já em **b** quelíceras labdognatas opostas entre si.

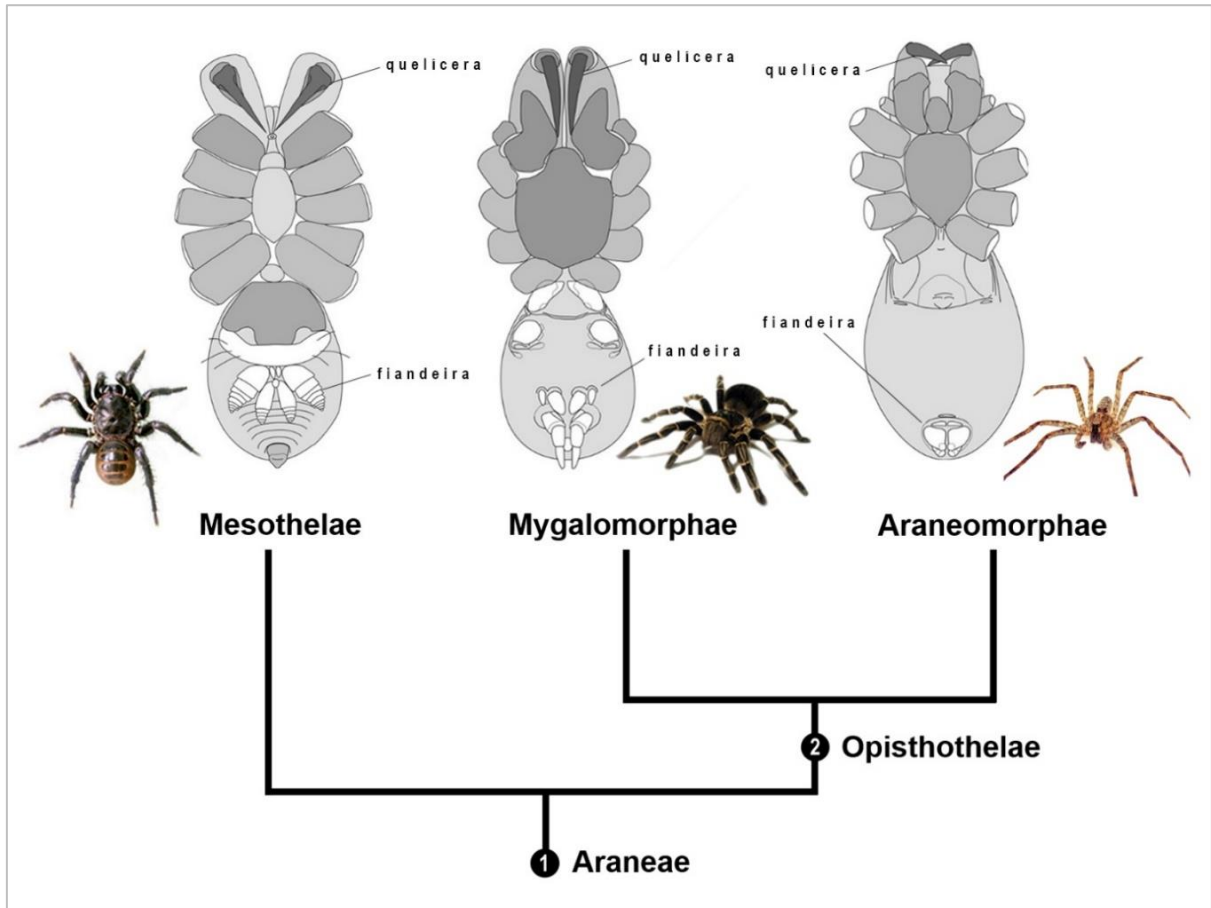


Fonte: Imagem retirada de Foelix (2011).

7 Por fim, a infraordem Araneomorphae compreende mais de 90% de
 8 toda a diversidade de aranhas existente (GARRISON *et al.*, 2016), distribuída em
 9 vários subgrupos incluindo Austrochiloidea, Palpimanoidea, Synspermiata e
 10 Entelegynae (PLATNICK, 2020). A superfamília Lycosoidea faz parte do subgrupo
 11 Entelegynae, e compreende os chamados licosoideos superiores ou verdadeiros,
 12 abrigando as famílias Lycosidae, Pisauridae, Ctenidae, Psecridae, Thomisidae,
 13 Oxyopidae e Trechaleidae (POLOTOW, CARMICHAEL e GRISWOLD, 2015).

14 Toda a organização sistemática de Araneae descrita acima pode ser
 15 observada de forma resumida na **Figura 6**.

Figura 6 Esquema representando um cladograma simplificado da ordem Araneae, demonstrando as relações filogenéticas dentro do grupo das aranhas e os principais caracteres que os distinguem. **Mesothelae:** aranhas da família Liphistiidae, **Mygalomorphae:** clado das tarântulas e **Araneomorphae:** clado das aranhas “verdadeiras” que representam 90% de todas as espécies existentes.



Fonte: Imagens: S. Scharf (InBioVeritas) e Schwendinger (2017).

- 1 A sistemática de aranhas vem apresentando novos avanços com o
- 2 passar dos anos, combinando dados de sequências de DNA e repositórios
- 3 morfológicos baseados em imagens digitais que, somados a técnicas computacionais
- 4 possibilitam a análise de grandes e complexos conjuntos de dados (WHEELER *et al.*,
- 5 2016). Desta forma, associando diferentes ferramentas e ampliando amostragens,
- 6 busca-se compreender cada vez mais a diversidade deste grupo bem como as suas
- 7 relações.

1 2.2 FAMÍLIA CTENIDAE

2 2.2.1 Aspectos Biológicos

3 Ctenidae Keyserling, 1877 compreende 593 espécies em 49 gêneros,
4 sendo uma grande família de aranhas araneomorfas, amplamente distribuídas em
5 florestas tropicais (POLOTOW e BRESCOVIT, 2018; WORLD SPIDER CATALOG,
6 2023). A classificação dos ctenídeos é baseada em uma série de caracteres
7 diagnósticos, como ausência de cribelo (na maior parte das espécies), oito olhos
8 posicionados em três fileiras, presença de duas garras tarsais, as fêmeas geralmente
9 exibem epígino com chifres laterais, entre outros caracteres (JOCQUÉ e DIPPENAR-
10 SCHOEMAN, 2006).

11 Também conhecidas como “*tropical wolf spiders*”, as espécies de
12 Ctenidae podem ser distinguidas pelo arranjo ocular do tipo 2-4-2 (ocasionalmente 4-
13 2-2) organizado em três fileiras, como observado na **Figura 7** (GRISWOLD *et al.*,
14 2005; JOCQUÉ e DIPPENAR-SCHOEMAN, 2006; POLOTOW e BRESCOVIT, 2014).
15 Apesar de apresentar oito olhos como a maioria das aranhas, a disposição desses
16 olhos em três fileiras é uma sinapomorfia deste grupo, já que o mais comum nas outras
17 espécies são olhos dispostos em apenas duas fileiras (JOCQUÉ e DIPPENAR-
18 SCHOEMAN, 2006). Os olhos possuem uma estrutura em forma de grade chamada
19 tapetum, estrutura esta que permite a visão noturna, porém, esta não é uma
20 característica exclusiva dos ctenídeos (GRISWOLD *et al.*, 2005; JOCQUÉ e
21 DIPPENAR-SCHOEMAN, 2006).

22 Esta família compõe um grupo de aranhas majoritariamente
23 ecribeladas, com raras exceções (gêneros *Acanthoctenus* Keyserling, 1877 e
24 *Viracucha* Lehtinen, 1967). Aranhas ecribeladas não possuem o cribelo, estrutura
25 resultante da fusão ou redução das fiandeiras medianas anteriores. O cribelo é uma
26 sinapomorfia de Araneomorphae, contudo, na grande maioria das espécies esta
27 estrutura foi perdida ou reduzida a um colulus não funcional (GRISWOLD *et al.*, 2005;
28 JOCQUÉ e DIPPENAR-SCHOEMAN, 2006; FOELIX, 2011; WHEELER *et al.*, 2016;
29 PLATNICK, 2020).

Figura 7 Importante caráter descritivo de Ctenidae: disposição dos oito olhos em três fileiras, representado pelo arranjo ocular do tipo 2-4-2. A esquerda esquema retirado de Jocqué e Dippenaar-Schoeman (2006) e a direita foto da espécie *Enoploctenus cyclothorax*.

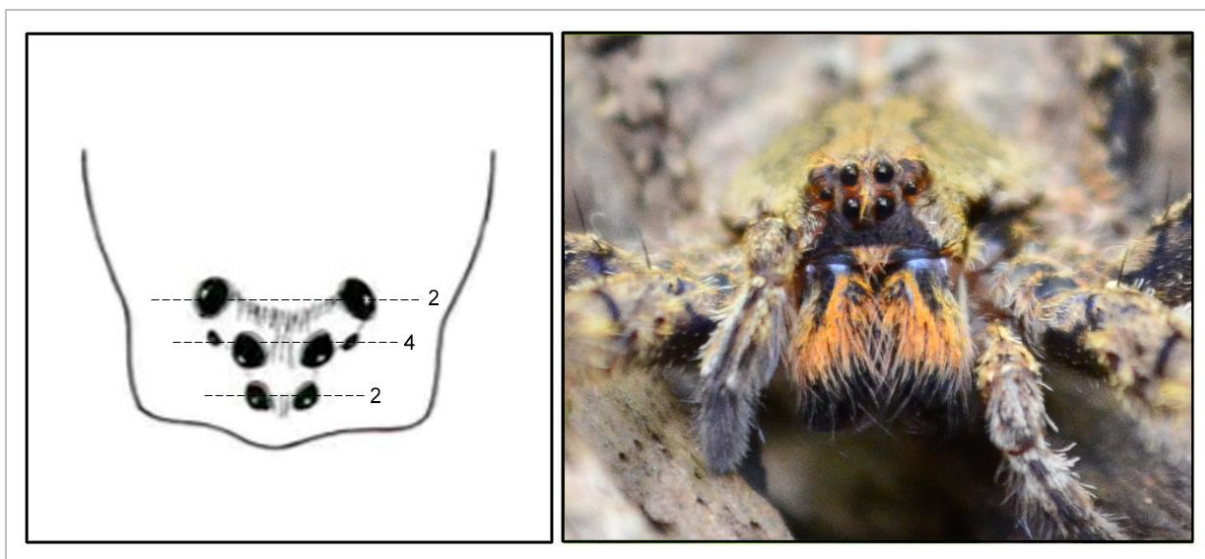


Foto: Dr. Matheus Pires Rincão.

1 Os ctenídeos variam de pequeno a grande porte, medindo de 4 a 40
 2 mm de comprimento corpóreo total (JOCQUÉ e DIPPENAR-SCHOEMAN, 2006;
 3 POLOTOW e BRESOVIT, 2014). São caracterizados por serem predadores
 4 generalistas, caçadores ativos que não dependem de armadilhas para captura de
 5 suas presas (espécies errantes), exibindo uma dieta composta basicamente por
 6 insetos, assim como a grande maioria das aranhas (GONZAGA, SANTOS e
 7 JAPYASSÚ, 2007; JOCQUÉ e DIPPENAR-SCHOEMAN, 2006; FOELIX, 2011).
 8 Platnick (2020) e Deacon, Farrell e Fraser (2015) ainda acrescentam que pequenos
 9 sapos e peixes também podem ser predados por ctenídeos.

10 No geral essas espécies apresentam hábitos noturnos, são rápidas e
 11 pouco fazem uso da seda (GRISWOLD *et al.*, 2005; JOCQUÉ e DIPPENAR-
 12 SCHOEMAN, 2006; FOELIX, 2011; POLOTOW e BRESOVIT, 2014). São
 13 habituadas a caminhar no solo de ambientes florestais, forrageando microhabitats
 14 atrás de suas presas, porém, Dias *et al.* (2010) ressaltam que as espécies de Ctenidae
 15 devem ser divididas em dois grupos: os que caçam suas presas preferencialmente no
 16 solo e os que utilizam outros estratos para isso, como galhos, troncos de árvores ou
 17 ramos de vegetação. Este é o caso de espécies arborícolas do gênero *Enoploctenus*
 18 Simon, 1897, gênero de interesse do presente trabalho.

19 Para muitas pessoas as aranhas são tidas como seres repugnantes,

1 assustadores ou perigosos e, por este motivo, muitas vezes são vistas como algo a
2 ser eliminado. A verdade é que a importância desses animais para o ambiente ainda
3 é desconhecida por muita gente. As aranhas exercem um importante papel ecológico,
4 incluindo ctenídeos que são essencialmente predadores, oferecendo controle na
5 dinâmica populacional principalmente de insetos e de outras presas (VANKHEDE,
6 HADOLE e CHAKRAVARTHY, 2016; PLATNICK, 2020). É desta forma que esses
7 predadores auxiliam a manter o equilíbrio do ecossistema, influenciando inclusive no
8 controle de potenciais pragas agrícolas (VANKHEDE, HADOLE e CHAKRAVARTHY,
9 2016).

10 Em um pequeno fragmento florestal de quase meio hectare (4.047 m²)
11 estima-se que mais de 36 quilos de insetos sejam devorados por aranhas em um ano.
12 Se considerarmos a população mundial de aranhas, estima-se que em um ano, de
13 400 a 800 milhões de toneladas de presas sejam predadas (VANKHEDE, HADOLE e
14 CHAKRAVARTHY, 2016; PLATNICK, 2020). Há mais de uma década alguns
15 trabalhos vem ressaltando o potencial das aranhas no controle biológico em
16 agroecossistemas (ROMERO, 2007; VANKHEDE, HADOLE e CHAKRAVARTHY,
17 2016; BENAMÚ *et al.*, 2017). Portanto, esforços voltados para a conservação desses
18 animais são extremamente importantes também da perspectiva econômica.

19 Além disso, produtos provenientes da seda e do veneno de aranhas
20 vem sendo considerados bastante promissores. Segundo Vankhede, Hadole e
21 Chakravarthy (2016) a seda produzida pelas aranhas é um dos melhores biomateriais
22 existentes e, assim como estes autores, Foelix (2011) e Platnick (2020) também
23 chamam a atenção para a alta resistência à tração que essa seda apresenta.
24 Pesquisadores vêm estudando maneiras de utilização da seda das aranhas para
25 fabricação de produtos igualmente fortes (PLATNICK, 2020), assim, tais fibras
26 naturais podem ter ampla aplicação biotecnológica futuramente (FOELIX, 2011).

27 A grande maioria das aranhas produzem veneno, portanto são
28 potencialmente venenosas, porém, apenas 200 espécies alocadas em 4 gêneros
29 representam perigo a saúde dos humanos (FOELIX, 2011; VANKHEDE, HADOLE e
30 CHAKRAVARTHY, 2016). Espécies do gênero *Phoneutria* Perty, 1833, pertencentes
31 a Ctenidae, são conhecidas como “armadeiras” e classificadas como as mais
32 perigosas, consideradas aranhas de importância médica devido ao efeito altamente
33 neurotóxico da sua peçonha. Por serem bastante agressivas e habituadas a
34 ambientes antrópicos, acabam provocando muitos acidentes anualmente (FOELIX,

1 2011). Peigneur, Lima e Tytgat (2018) analisaram a potencialidade do veneno de *P.*
2 *nigriventer* (Keyserling, 1891) e o considerou como um tesouro inexplorado, formado
3 por componentes que fazem dele uma ferramenta farmacológica promissora para a
4 descoberta de novas drogas.

5 2.2.2 Considerações Sistemáticas

6 Muitos trabalhos filogenéticos vêm sendo desenvolvidos nos últimos
7 anos, buscando melhor compreender as relações dentro de Araneae, a partir de
8 evidências morfológicas, comportamentais e moleculares. Atualmente, Ctenidae está
9 inserida dentro da superfamília monofilética Lycosoidea junto com outras seis famílias:
10 Lycosidae; Pisauridae; Psechridae; Thomisidae; Oxyopidae e Trechaleidae
11 (POLOTOW, CARMICHAEL e GRISWOLD, 2015).

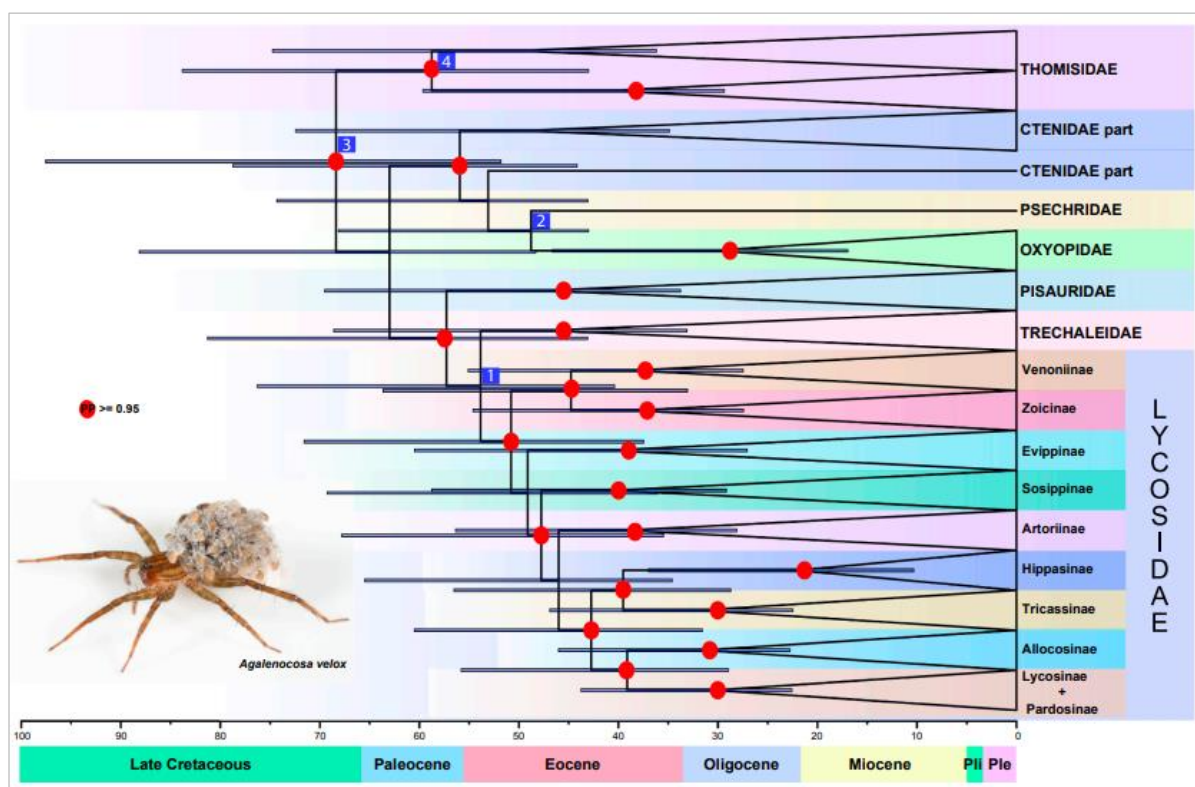
12 Apesar de estar bem delimitada, as relações dentro da superfamília
13 Lycosoidea não estão totalmente bem resolvidas, principalmente no que se refere a
14 posição da família Ctenidae. Segundo Silva Davila (2003), quando se trata dos
15 ctenídeos, as relações com as outras famílias são difíceis de serem estabelecidas em
16 decorrência de homoplasias. Diante disso, muitas filogenias que foram estabelecidas
17 caracterizam Ctenidae como não monofilética (SILVA DAVILA, 2003; POLOTOW e
18 BRESCOVIT, 2014; POLOTOW, CARMICHAEL e GRISWOLD, 2015; HENRARD e
19 JOCQUÉ, 2016; PIACENTINI e RAMÍREZ, 2019).

20 No geral, as famílias Lycosidae e Trechaleidae apresentam-se como
21 grupos irmãos bem sustentados nas filogenias moleculares publicadas, formando um
22 clado bem delimitado junto com Pisauridae (WHEELER *et al.*, 2016; ALBO *et al.*, 2017;
23 FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; PIACENTINI E RAMÍREZ, 2019). A colocação de
24 Thomisidae como grupo irmão do clado formado por todas as outras famílias de
25 Lycosoidea também parece ser consenso na maioria das filogenias (GARRISON *et*
26 *al.*, 2016; WHEELER *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; PIACENTINI e RAMÍREZ,
27 2019).

28 Por outro lado, Ctenidae, assim como Oxyopidae e Psechridae, são
29 Lycosoides que não apresentam relações evolutivas bem estabelecidas. Por exemplo,
30 tanto Psechridae quanto Oxyopidae já foram agrupadas junto com Thomisidae como
31 clado mais basal, como observado por Wheeler *et al.* (2016) e Fernández *et al.* (2018),

1 respectivamente. No trabalho realizado por Piacentini e Ramírez (2019), ambas são
 2 agrupadas num mesmo clado, que tem como grupo irmão Ctenidae (**Figura 8**).

Figura 8 Filogenia datada da família Lycosidae e dos grupos mais próximos a ela. Círculos vermelhos representam probabilidades posteriores iguais ou superiores a 0,95. Nesta árvore observa-se Ctenidae mais próximo das famílias Psechridae e Oxyopidae.



Fonte: Imagem retirada de Piacentini e Ramírez (2019).

3 Segundo Wheeler *et al.* (2016), Ctenidae continua sendo um clado
 4 problemático e difícil de ser delimitado, que já foi considerado como grupo irmão do
 5 clado formado por Lycosidae, Trechaleidae e Pisauridae por Fernández *et al.* (2018)
 6 e de Oxyopidae por Garrison *et al.* (2016) e Wheeler *et al.* (2016). São essas
 7 incertezas que ressaltam a necessidade de novas revisões taxonômicas voltadas para
 8 Ctenidae, que melhor expliquem sua colocação dentro de Lycosoidea.

9 Além disso, dentro de Ctenidae muitos grupos ainda permanecem mal
 10 resolvidos e alguns autores têm chamado a atenção para a criação de novos gêneros
 11 nesta família, bem como realocações de espécies mal posicionadas (SILVA DAVILA,
 12 2003, 2004; POLOTOW e BRESOVIT, 2014; POLOTOW, CARMICHAEL e
 13 GRISWOLD, 2015; WHEELER *et al.*, 2016; HERARD e JOCQUÉ, 2016). Este é o
 14 caso do gênero *Cupiennius* Simon, 1891 que vinha sendo questionado há vários anos,

1 mas somente recentemente foi realocado após Piacentini e Ramírez (2019) proporem
2 sua transferência para a família Trechaleidae.

3 Por fim, alguns trabalhos filogenéticos também questionam as
4 relações evolutivas das subfamílias encontradas dentro de Ctenidae. Anteriormente,
5 de acordo com caracteres morfológicos Silva Davila (2003) e Polotow e Brescovit
6 (2014) afirmaram que Ctenidae compreendia cinco linhagens principais: Acantheinae,
7 Acanthoecteninae, Caloecteninae, Cteninae e Viridasiinae, sendo as duas últimas
8 agrupadas como linhagens relacionadas. Polotow, Carmichael e Griswold (2015)
9 elevaram Viridasiinae de subfamília a família (Viridasiidae), com base na associação
10 de caracteres morfológicos, comportamentais e moleculares, propondo que
11 viridasiines fossem excluídos de Ctenidae. Baseado nisso, Hazzi *et al.* (2018) já não
12 consideraram espécies de Viridasiinae em suas análises. Neste trabalho, Cteninae
13 agrupa-se como grupo-irmão de Acantheinae, linhagem a qual pertencem as espécies
14 do gênero *Enoploctenus* que, como mencionado anteriormente, é o gênero alvo desta
15 tese.

16 2.2.3 Contextualização do Gênero *Enoploctenus* e da espécie *E. cyclothorax*

17 O gênero neotropical *Enoploctenus* foi inicialmente descrito por Simon
18 em 1897 e conta atualmente com oito espécies válidas, quatro delas ocorrem no
19 Brasil, as outras são encontradas no Equador, Guiana e St. Vicente (mar do Caribe)
20 (WORLD SPIDER CATALOG, 2023). De acordo com o SpeciesLink (2023) a maioria
21 dos registros de ocorrência de *Enoploctenus* está concentrada nos estados das
22 regiões Sul e Sudeste do Brasil, casos isolados foram registrados em Alagoas, no
23 Acre, Amazonas, Napo (Equador) e Cusco (Peru). É válido ressaltar que na maior
24 parte desses registros não há a identificação a nível de espécie, desta forma fica
25 evidente a necessidade de análises taxonômicas voltadas à *Enoploctenus*, grupo este
26 ainda pouco explorado em diferentes áreas da ciência.

27 A descrição realizada por Simon (1897) caracterizava *Enoploctenus*
28 por um conjunto de aspectos morfológicos, como parte torácica (do cefalotórax) mais
29 baixa, olhos medianos muito grandes dispostos em quadrado, olhos laterais anteriores
30 pequenos e localizados abaixo dos medianos posteriores (formando uma linha curva),
31 quelíceras quadridentadas e pernas longas com espinhos. Algumas revisões

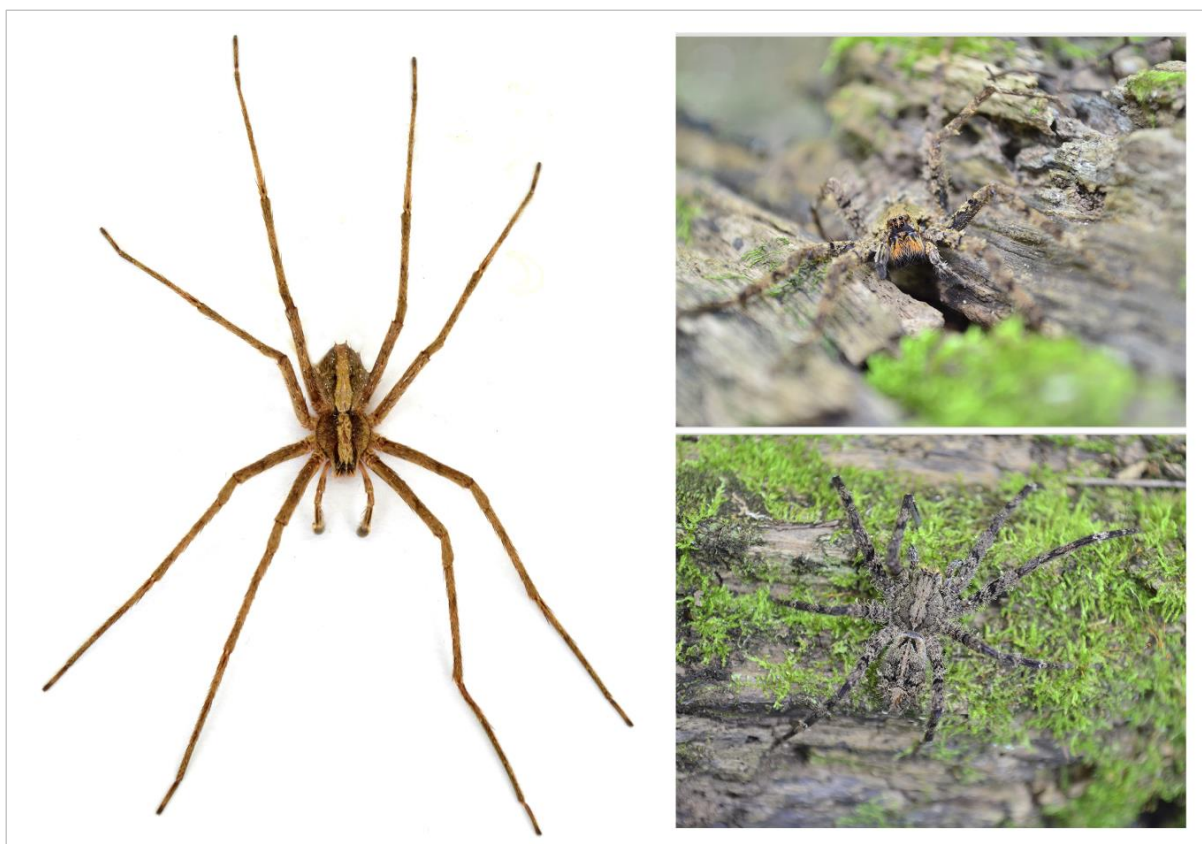
1 taxonômicas foram realizadas ao longo dos anos e com elas muitas espécies
2 acabaram sendo realocadas. No trabalho de Bucherl (1950) por exemplo, por meio de
3 uma revisão do gênero muitas espécies sinônimas foram identificadas, agrupadas e
4 renomeadas. Outros trabalhos com importantes realocações de espécies mal
5 posicionadas foi o de Silva-Dávila (2004) e Polotow e Brescovit (2014).

6 Os aspectos biológicos do gênero *Enoploctenus* são poucos
7 conhecidos, o que se sabe é que as espécies de porte relativamente grande são
8 noturnas, velozes e geralmente arborícolas, encontradas em troncos de árvores e pela
9 vegetação (BUCHERL, 1950; REGO, VENTICINQUE e BRESCOVIT, 2007;
10 WILLEMART e LACAVA, 2017). Trajano (2020) também descreve *Enoploctenus* como
11 troglóxenos (encontrados em habitats subterrâneos, mas retornam para a superfície
12 para completar seu ciclo de vida), que utilizam cavernas para abrigo e reprodução.

13 Muitos levantamentos da araneofauna vem sendo desenvolvidos no
14 Brasil, parte deles descrevendo a diversidade de aranhas cavernícolas, incluindo
15 *Enoploctenus* nessas listas (INIESTA *et al.*, 2012; ZEPON e BICHUETTE, 2017;
16 BERNARDI *et al.*, 2020; TRAJANO, 2020). Descrições de *Enoploctenus* presentes em
17 áreas de florestas também existem (FLOREN e DEELEMANN-REINHOLD, 2005;
18 REGO, VENTICINQUE e BRESCOVIT, 2005, 2007; CHAVARI, CIPOLA e
19 BRESCOVIT, 2014; BERTANI *et al.*, 2015; CASTANHEIRA, PÉREZ-GONZÁLEZ e
20 BAPTISTA, 2016; ZEQUI, ORSI e SOUZA-SHIBATTA, 2019; BOAS JUNIOR,
21 FERREIRA e SOUZA, 2020). Por fim, Nogueira *et al.* (2014) ainda relatam a
22 identificação de *Enoploctenus* na montanha mais alta no Brasil, no Amazonas, à 1.550
23 metros de altitude.

24 A espécie-tipo do gênero é *E. cyclothorax* (POLOTOW e
25 BRESCOVIT, 2014) (**Figura 9**), espécie Sul-Americana que ocorre associada a
26 regiões de mata, mais especificamente ao bioma Mata Atlântica. Os registros de
27 ocorrência desta espécie se concentram nas regiões sul e sudeste do Brasil,
28 abrangendo especialmente a Serra do Mar, do Rio de Janeiro até Santa Catarina
29 (**Figura 10**) (SPECIESLINK, 2023).

Figura 9 Exemplos de *Enoploctenus cyclothorax*, objeto de estudo do presente trabalho. A esquerda exemplar já armazenado em álcool 70%, fotografado no laboratório e a direita exemplar fotografado no local de coleta.



Fotos: Dr. Matheus Pires Rincão.

Figura 10 Mapa de distribuição geográfica de exemplares de *Enoploctenus cyclothorax* no Brasil, América do Sul.



Fonte: Imagem retirada do site SpeciesLink (<https://specieslink.net/search/>).

1 Esta aranha possui hábitos noturnos para caça e reprodução, e utiliza
2 uma variedade de refúgios naturais como refúgio durante o dia, como fendas e buracos
3 em troncos de árvores. As fêmeas são preferencialmente arborícolas e permanecem
4 em repouso, enquanto os machos adultos têm maior mobilidade sobre o substrato.
5 Apesar disso, no geral o que se observa é que tanto machos quanto fêmeas se
6 locomovem pouco (WILLEMART e KANETO, 2004) portando, a dispersão limitada é
7 uma característica da espécie.

8 Artrópodes compõem a base alimentar de *E. cyclothorax*, que predam
9 especialmente baratas, moscas, grilos e até outras espécies de aranhas. Poucas
10 informações bibliográficas sobre fatores reprodutivos estão disponíveis para a
11 espécie, sabe-se que machos adultos são encontrados com maior frequência na
12 primavera do que no inverno (WILLEMART e KANETO, 2004), e que espécies de
13 Ctenidae depositam cerca de 800 a 1.200 ovos (Bücherl, 1950).

14 Neste tópico podemos compreender a grande representatividade do
15 Brasil em abrigar os exemplares de *E. cyclothorax*, bem como a maior diversidade de
16 *Enoploctenus* existente, contudo, o real cenário do gênero está longe de ser
17 esclarecido. Identificações a nível de espécies ainda são necessárias, análises da
18 variabilidade genética precisam ser exploradas e o impacto da fragmentação dos
19 habitats não são totalmente compreendidos.

20 2.3 GENÔMICA POPULACIONAL

21 A análise genética a nível genômico vem ganhando cada vez mais
22 espaço e, de acordo com Luikart *et al.* (2003) a genômica populacional pode ser
23 definida como o estudo simultâneo de vários *loci* ou regiões do genoma.

24 O grande diferencial da genômica populacional é o uso de
25 marcadores genéticos em alta densidade, proporcionando dados genômicos em larga
26 escala capazes de fornecer informações mais completas dos parâmetros genéticos
27 em todo o genoma. Esta abordagem pode oferecer mais marcadores genéticos, com
28 custo e esforço de pesquisa semelhantes à abordagem tradicional, principalmente
29 quando se trata de táxons não-modelos (LUIKART *et al.*, 2018).

30 A viabilidade da genômica de populações está intimamente
31 relacionada com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA, como por

1 exemplo, o Sequenciamento de Próxima Geração (*Next-Generation Sequencing* -
2 *NGS*), um sequenciamento de alto rendimento onde milhões de reações de
3 sequenciamento de DNA podem ser executadas simultaneamente em um único lote,
4 acelerando o processo e aumentando consideravelmente a quantidade de sequências
5 obtidas. Contudo, muitas plataformas utilizadas nesse processo são relativamente
6 novas e caras, desta forma, a terceirização do custo do sequenciamento tem se
7 tornado cada vez mais eficaz (ROWE, SWEET e BEEBEE, 2017).

8 Métodos de redução da complexidade de genoma têm sido
9 amplamente explorados e, dentre eles, a Genotipagem por Sequenciamento
10 (*Genotyping by sequencing* – *GBS*) se destaca por ser o método de menor custo
11 (LUIKART *et al.*, 2018). Narum *et al.* (2013) consideram o desenvolvimento da GBS
12 um dos grandes avanços recentes, permitindo que uma fração do genoma seja
13 sequenciada por NGS ao invés de todo o genoma. Esta é uma abordagem baseada
14 em enzimas de restrições que fazem cortes aleatórios no genoma, assim, milhares de
15 polimorfismos podem ser rastreados fornecendo grandes vantagens para a genômica
16 populacional (NARUM *et al.*, 2013; LUIKART *et al.*, 2018).

17 2.4 MARCADORES MOLECULARES: SNPs E COI

18 Naturalmente muitos tipos de mutações ocorrem nos genomas e,
19 dentre eles, os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide*
20 *Polymorphisms* - *SNPs*) se destacam por sua abundância e distribuição uniforme no
21 genoma (KAHL *et al.*, 2005). Podem ser definidos como um sítio de nucleotídeo
22 presente em uma sequência de DNA que é polimórfico em uma população, resultado
23 das transições e transversões. Neste contexto, os SNPs têm grande potencial na
24 genética da conservação, e podem ser utilizados como marcadores na avaliação da
25 variação genética dentro e entre populações (ALLENDORF e LUIKART, 2007).

26 Estes marcadores comumente bialélicos, apresentam uma taxa de
27 mutação relativamente baixa (em média 8 a 10 mutações por nucleotídeo a cada
28 geração) (MORIN *et al.*, 2004), podendo ser encontrados tanto em regiões
29 codificadoras (éxons) quanto não codificadoras (íntrons e regiões intergênicas),
30 porém, a maior parte encontra-se nas regiões não codificantes (KAHL *et al.*, 2005).

31 Devido à natureza bialélica dos SNPs e sua menor taxa de mutação,

1 os SSR acabam sendo mais informativos por *locus* examinado, porém, por estarem
2 abundantemente e amplamente distribuídos no genoma tornam-se uma grande
3 promessa nas análises genéticas (LIU *et al.*, 2005; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

4 Outro marcador com destaque na genética de populações é o DNA
5 *barcoding*. Também citado como código de barras de DNA, refere-se a região gênica
6 citocromo c oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial (mtDNA), região curta
7 de aproximadamente 600 pares de bases (pb) (HEBERT, RATNASINGHAM e
8 WAARD, 2003; JINBO *et al.*, 2011). Segundo Hebert, Ratnasingham e Waard (2003),
9 esta região é considerada um bom alvo por estarem presentes em todos os animais e
10 por apresentarem uma diversidade de sequência suficiente para discriminação de
11 espécies próximas.

12 O uso do DNA *barcoding* em delimitações de grupos taxonômicos de
13 aranhas vem sendo bastante utilizado nas últimas duas décadas, desde que Hebert,
14 Ratnasingham e Waard (2003) propuseram o sistema de identificação da vida animal
15 baseado no gene mitocondrial COI. Identificações taxonômicas realizadas em
16 diferentes regiões do mundo afirmam a eficácia do gene COI na discriminação de
17 espécies de aranhas (BARRETT e HEBERT, 2005; ROBINSON *et al.*, 2009;
18 BLAGOEV *et al.*, 2013; ASTRIN *et al.*, 2016; GAIKWAD *et al.*, 2016; HENRARD e
19 JOCQUÉ, 2017); WANG *et al.*, 2017; ASHFAQ *et al.*, 2019; TYAGI *et al.*, 2019;
20 ASHRAAF *et al.*, 2020; HAZZI e HORMIGA, 2021).

21 A divergência genética média encontrada na região COI de
22 artrópodes geralmente é ligeiramente maior do que em outros filos animais,
23 principalmente em quelicerados e crustáceos, apesar disso, o COI se mantém como
24 ferramenta eficaz no reconhecimento de espécies mesmo em espécies com
25 divergências mais elevadas (HEBERT, RATNASINGHAM e WAARD, 2003). Vários
26 trabalhos com aranhas adotam o limiar de 2% para a delimitação de espécies, desde
27 que HEBERT, RATNASINGHAM e WAARD (2003) observaram divergências
28 superiores a 2% para a maior parte dos pares de espécies analisados. Conforme
29 novos estudos foram sendo realizados, percebeu-se que em alguns casos este limiar
30 pode se aproximar de 3% (BARRETT e HEBERT, 2005; GAIKWAD *et al.*, 2016;
31 WANG *et al.*, 2017; TYAGI *et al.*, 2019; ASHFAQ *et al.*, 2019), o que é esperado
32 considerando a alta divergência genética constatada em Chelicerata.

1 2.5 ESTUDOS GENÉTICO-POPULACIONAIS EM ARANHAS

2 Estudos genéticos populacionais são inexistentes no gênero
3 *Enoploctenus* e, considerando toda a família Ctenidae, apenas um trabalho recente
4 analisou populações de uma espécie do gênero *Ancylometes* Bertkau, 1880
5 (SALGADO-ROA *et al.*, 2021). Neste trabalho, estatísticas de diversidade e estrutura
6 genética foram estimadas a partir de dois *loci* (citocromo c oxidase I – COI e *Internal*
7 *Transcribed Spacer* - ITS2), evidenciando duas linhagens principais de *A. bogotensis*
8 (Keyserling, 1877) separadas pela Cordilheira Oriental dos Andes colombianos. Uma
9 forte diferenciação genética entre essas duas linhagens foi observada, suportada por
10 altos valores de estruturação genética.

11 Expandindo o levantamento bibliográfico para a superfamília
12 Lycosoidea, os trabalhos de genética de populações se concentram basicamente na
13 família Lycosidae, voltados para o desenvolvimento de marcadores moleculares
14 microssatélites (SSR) (HATAWAY, REED e NOONAN, 2011; LI *et al.*, 2020) e também
15 para análises de diversidade e, principalmente, de estrutura genética (CHANG, SONG
16 e ZHOU, 2007; JIYING *et al.*, 2007; MACRINI, PERES e SOLFERINI, 2015;
17 GONZÁLEZ-TRUJILLO *et al.*, 2016; TANIKAWA *et al.*, 2018; POSTIGLIONI *et al.*,
18 2019). Na maior parte desses trabalhos detecta-se estrutura populacional, com forte
19 e significativa diferenciação genética nas espécies avaliadas. Em alguns casos os
20 autores chamam a atenção para presença de linhagens genéticas distintas nos locais
21 amostrados, possivelmente decorrentes do fluxo gênico interrompido. Além disso,
22 comumente análises para avaliar a correlação da distância geográfica com a
23 diferenciação genética populacional são realizadas, porém, os resultados costumam
24 não ser significativos, sugerindo influência de fatores históricos nas diferenciações
25 genéticas encontradas.

26 Recentemente Akpinar e Mammadova (2020) analisaram o gene
27 mitocondrial COI de *Bassaniodes pseudorectilineus* (Wunderlich, 1995),
28 representante da família Thomisidae, e observaram fluxo gênico contínuo entre as
29 populações, que não foram totalmente separadas umas das outras na análise de
30 estrutura.

31 Em Araneae, as famílias Araneidae, Pholcidae, Antrodiaetidae,
32 Tetragnathidae, Hexathelidae, Hypochilidae e Nesticidae também tiveram
33 representantes analisados (RAMIREZ e FANDINO, 1996; RAMIREZ e HAAKONSEN,

1 1999; SCHAFER, HILLE e UHL, 2001; RAMIREZ e CHI, 2004; JUNG *et al.*, 2006;
2 ARNEDO e FERRÁNDEZ, 2007; KEITH e HEDIN, 2012; PARMAKELIS *et al.*, 2013;
3 DIMASSI *et al.*, 2017; SALGADO-ROA *et al.*, 2018; BALOGH *et al.*, 2020).

4 Diferentes tipos de marcadores moleculares foram utilizados nesses
5 estudos, tanto de origem nuclear, como por exemplo os SSR e o AFLP (*Amplified*
6 *Fragment Length Polymorphism*), quanto de origem mitocondrial, sendo o gene COI o
7 marcador mais explorado até então. Dos trabalhos acima mencionados, apenas
8 Balogh *et al.* (2020) realizaram uma análise populacional a nível genômico, baseada
9 em um conjunto de marcadores de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

10 Macrini, Peres e Solferini (2015) já chamavam a atenção para a
11 escassez de estudos sobre a distribuição da diversidade genética em populações
12 naturais de aranhas tropicais. Sete anos se passaram e o avanço desses estudos
13 nesta área ainda é lento, principalmente considerando a família Ctenidae, e também
14 Lycosoidea e Araneae como um todo.

15 2.6 FRAGMENTAÇÃO DAS FLORESTAS E O IMPACTO NAS POPULAÇÕES NATURAIS

16 As florestas tropicais são caracterizadas mundialmente como um dos
17 ecossistemas mais ricos em diversidade biológica (GUEDES e SEEHUSEN, 2011).
18 Dentre elas, a Mata Atlântica que originalmente cobria cerca de 150 milhões de
19 hectares, é considerada uma das maiores e mais ricas florestas do continente
20 americano. A partir de consecutivos eventos econômicos e desenvolvimento urbano,
21 houve uma intensa devastação desta floresta, restando atualmente apenas 12,4% de
22 toda a vegetação original deste bioma (RIBEIRO *et al.*, 2009; PARQUE ESTADUAL
23 SERRA DO MAR, 2015; SOS MATA ATLÂNTICA, 2023).

24 Vários trabalhos concluíram que a fragmentação florestal está
25 intimamente associada a riqueza e a abundância de espécies de aranhas (REGO,
26 VENTICINQUE e BRESCOVIT, 2005, 2007; STEFANI e DEL-CLARO, 2015; BOAS
27 JUNIOR, FERREIRA e SOUZA, 2020). Quanto maior o fragmento maior a riqueza de
28 espécies, desta forma, fragmentos maiores devem ser prioritariamente preservados,
29 assim como conexões de fragmentos pequenos e isolados às florestas contínuas são
30 importantíssimas, já que a perda de diversidade nesses casos é muito grande assim
31 como o processo de recolonização é muito lento (FLOREN e DEELEMAN-

1 REINHOLD, 2005; BOAS JUNIOR, FERREIRA e SOUZA, 2020). Segundo Vankhede,
2 Hadole e Chakravarthy (2016) o desmatamento está entre as principais ameaças
3 responsáveis pela diminuição populacional destes invertebrados.

4 O impacto da fragmentação populacional sobre a diversidade e a
5 diferenciação genética, sobre a endogamia e sobre o risco de extinção vai depender
6 do fluxo gênico entre as populações. Por isso, a conectividade entre fragmentos
7 florestais é tão importante para estes organismos, assim como estudos que avaliem
8 os efeitos da fragmentação de habitats sobre a variabilidade genética populacional
9 das espécies (FRANKHAN, BALLOU e BRISCOE, 2008).

10 O desmatamento acaba alterando todo o ecossistema, porém, as
11 consequências de tais alterações raramente são adequadamente investigadas
12 (FLOREN e DEELEMEN-REINHOLD, 2005). Um exemplo dessa falta de investigação
13 adequada é o levantamento de espécies de aranhas consideradas ameaçadas de
14 extinção na Mata Atlântica, de acordo com o Instituto Chico Mendes de Conservação
15 da Biodiversidade (2018), apenas 20 espécies são consideradas vulneráveis, em
16 perigo ou criticamente em perigo, apresentando elevado risco de extinção.
17 Considerando a riqueza de espécies existente e o impacto da destruição do habitat
18 nesses organismos, logo imaginamos que este número seja subestimado.

19 2.7 CONSERVAÇÃO FLORESTAL NO ESTADO DO PARANÁ

20 A Fundação SOS Mata Atlântica é uma ONG ambiental brasileira que
21 se dedica a conservação da Mata Atlântica (SOS MATA ATLÂNTICA, 2023). Desde
22 1990 esta ONG desenvolve um importante trabalho de monitoramento dos
23 remanescentes florestais deste bioma criticamente ameaçado, trabalho este realizado
24 em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (FUNDAÇÃO
25 SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2022).

26 No último período avaliado (2020-2021) foi detectado um
27 desmatamento total de 21.642 hectares de Mata Atlântica no Brasil e, deste total, 89%
28 se concentram em cinco estados: Minas Gerais, Bahia, Paraná, Mato Grosso do Sul
29 e Santa Catarina (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2022). Nos últimos
30 cinco períodos avaliados (2016-2021) o Paraná vem se mantendo em terceiro lugar
31 no ranking do desmatamento, totalizando 11.909 hectares perdidos (FUNDAÇÃO

1 SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2021; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE,
2 2022).

3 Apesar do Paraná continuar atuando significativamente na
4 modificação de suas paisagens naturais, é válido ressaltar que o estado detém o
5 segundo maior fragmento de Mata Atlântica brasileira, localizado na região litorânea
6 (RIBEIRO *et al.*, 2009), sendo este um importante fragmento de floresta a ser
7 conservado. Além disso, a preservação dos pequenos remanescentes florestais não
8 deve ser negligenciada, pois eles estão presentes em grande proporção ao longo do
9 estado e desempenham um papel essencial na conectividade de florestas (RIBEIRO
10 *et al.*, 2009). Quanto maior a conectividade entre remanescentes florestais, maiores
11 são as chances de que a biodiversidade resista as paisagens antropizadas
12 (TABARELLI *et al.*, 2012).

13 De acordo com o MapBiomas (2022) nos últimos 37 anos, enquanto
14 a vegetação florestal nativa retrocede, aumentam as áreas destinadas a agropecuária
15 e a urbanização. Juntos elas ocupam 66,7% do território atual da Mata Atlântica
16 brasileira, sendo a agropecuária a atividade em grande destaque no estado do
17 Paraná.

18 Apesar deste importante bioma ser reconhecido como Patrimônio
19 Nacional e estar teoricamente assegurado por políticas públicas como a Lei da Mata
20 Atlântica (Lei 11.428 de 2006), isso não têm garantido a devida proteção das florestas
21 (PINTO e HIROTA, 2022). Desta forma, é importante que haja um sistema de áreas
22 protegidas eficaz no país, que seja amparado e fiscalizado pelas três esferas
23 governamentais: municipal, estadual e federal.

24 As Unidades de Conservação (UCs), também reconhecidas como
25 parques e reservas, são áreas voltadas para a proteção da fauna e flora, também dos
26 micro-organismos, dos rios, solo e clima (WWF/UNIDADES DE CONSERVAÇÃO:
27 CONSERVANDO A VIDA, OS BENS E OS SERVIÇOS AMBIENTAIS, 2008; SOS
28 MATA ATLÂNTICA, 2023). Considerando o atual cenário do avanço do
29 desmatamento, as áreas protegidas são importantes ferramentas de conservação,
30 pois continuam sendo a principal estratégia de proteção dos remanescentes florestais
31 e da biodiversidade (WATSON *et al.*, 2014; PINTO e HIROTA, 2022).

32 As UCs por si só não são capazes de manter sob proteção extensas
33 áreas florestais, desta forma, a criação de corredores de biodiversidade é fundamental
34 para a conectividade de paisagens naturais isoladas (PINTO e HIROTA, 2022). Para

1 estabelecer essa conectividade, é imprescindível a criação de novas UCs para
2 restauração de trechos importantes e estratégicos. Considerando que 80% da
3 vegetação nativa da Mata Atlântica encontra-se em áreas particulares, se faz
4 necessária também a criação de UCs privadas, conhecidas como Reserva Particular
5 do Patrimônio Natural (RPPN) (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/RELATÓRIO
6 ANUAL 2021, 2021; PINTO e HIROTA, 2022).

7 De acordo com o MapBiomas Alerta (2022), 50% do desmatamento
8 registrado na Mata Atlântica em 2021 ocorreram em áreas particulares, isso só
9 confirma a urgente necessidade de criação de novas RPPNs que possam assegurar
10 a proteção de mais fragmentos, que contribuem com o estabelecimento de corredores
11 de conservação. Apesar do tamanho relativamente pequeno das áreas de RPPNs,
12 PEGAS e CASTTEY (2016) afirmam que elas contribuem significativamente em áreas
13 de *hotspot* de conservação, como é o caso da Mata Atlântica.

14 As paisagens antrópicas que dominam cada vez mais as áreas
15 florestais continuam impondo graves ameaças a biodiversidade, portanto todo
16 remanescente é essencial para a preservação das espécies (RIBEIRO *et al.*, 2009;
17 TABARELLI *et al.*, 2012). As áreas protegidas sob a forma de UCs, sejam elas
18 públicas ou privadas, continuam sendo a forma mais eficaz de proteção da
19 biodiversidade (PINTO e HIROTA, 2022) desta forma, a valorização e a criação de
20 novas UCs são fundamentais no atual cenário ambiental.

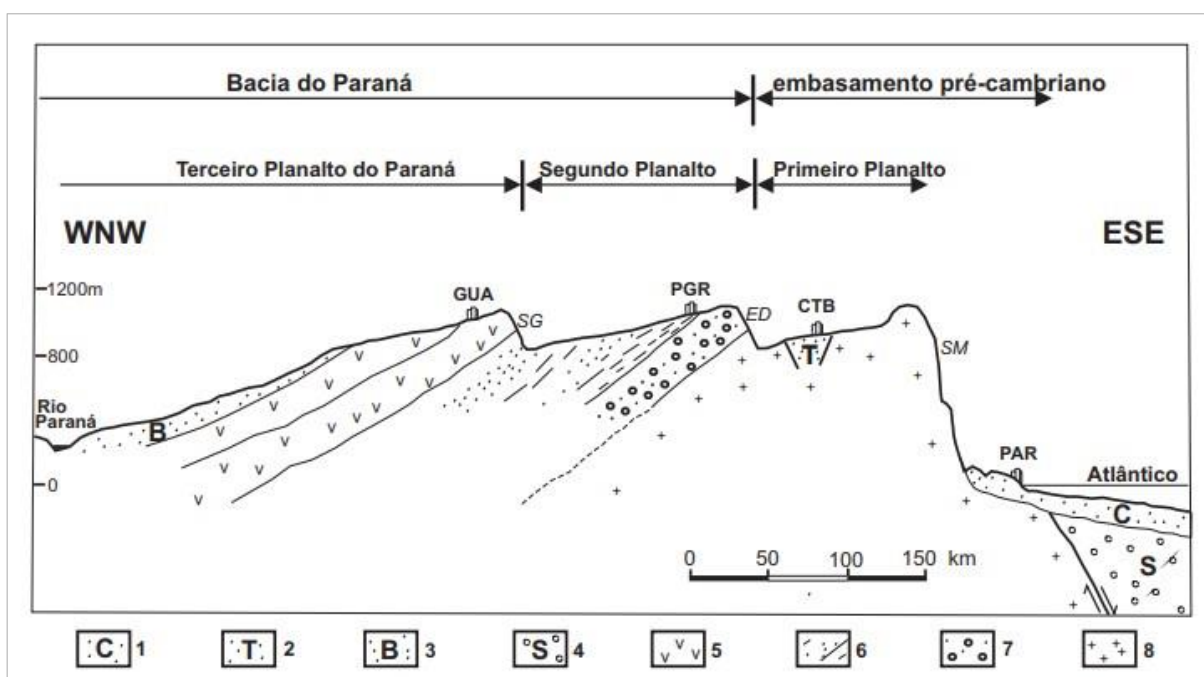
21 2.8 RELEVO E FITOFISIONOMIA DO PARANÁ

22 Além da fragmentação florestal outros fatores também podem estar
23 associados a diferenciação genética em populações naturais, como por exemplo
24 variações climáticas, distâncias geográficas, biologia da espécie, geologia, relevo,
25 fitofisionomia, entre outros. Ao longo do gradiente altitudinal do Paraná várias
26 formações florestais são observadas, adaptadas a diferentes climas e relevos. Esta
27 variação de paisagens confere um mosaico de habitats heterogêneo ao estado.

28 A compartimentação geomorfológica do Paraná é caracterizada por
29 planaltos escalonados e escarpas que, naturalmente, comportam-se como obstáculos
30 naturais. Do Leste para o Oeste observa-se a Planície Costeira, a Serra do Mar, o
31 Primeiro Planalto Paranaense, a Escarpa Devoniana, o Segundo Planalto

1 Paranaense, a Serra Geral e, finalmente, o Terceiro Planalto Paranaense (MELO *et*
 2 *al.*, 2007) (**Figura 11**). O relevo, portanto, impacta no conjunto de paisagens naturais
 3 que são observadas no estado (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Figura 11 Esquema representando a geologia e o relevo do estado do Paraná. Destaque para as Escarpas Serra do Mar (SM), Devoniana (ED) e Serra Geral (SG). Cidades destacadas: Paranaguá (PAR), Curitiba (CTB), Ponta Grossa (PGR) e Guarapuava (GUA). Legenda: 1: sedimentos cenozóicos da Planície Costeira e Plataforma Continental; 2: sedimentos cenozóicos da Bacia de Curitiba; 3: Grupos Bauru e Caiuá (Cretáceo); 4: Bacia de Santos; 5: derrames de basalto da Formação Serra Geral; 6: unidades paleozóicas e mesozóicas da Bacia do Paraná; 7: Formação Furnas; 8: embasamento pré-cambriano.



Fonte: Imagem retirada de Melo *et al.* (2007).

4 As principais fitofisionomias do Paraná são as Florestas Estacional
 5 Semidecidual (FES), Ombrófila Mista (FOM) e Ombrófila Densa (FOD). Além delas,
 6 em maiores altitudes, ocorrem também os Campos. Fatores como temperatura e
 7 precipitação pluviométrica condicionam e definem a distribuição das vegetações ao
 8 longo do estado (WREGE *et al.*, 2017).

9 A FOM, também conhecida como Floresta com Araucárias, é
 10 adaptada a temperaturas mais baixas, resistindo a geadas, e é frequentemente
 11 encontrada em zonas de maior altitude (500 a 1.200 metros), no segundo planalto
 12 paranaense, onde outros tipos de vegetação não se desenvolvem. Em particular, esta
 13 fitofisionomia deve ser reduzida drasticamente nos próximos 67 anos, como
 14 consequência das mudanças climáticas globais. Com o aquecimento do planeta,

1 estima-se que haverá retração de 96% desta floresta, que perderá espaço para a
2 Floresta Estacional Semidecidual (WREGGE *et al.*, 2017).

3 A FES, por sua vez, caracteriza-se por clima mais quente e altitudes
4 menores (abaixo de 500 metros). Esta vegetação ocorre no Norte, Noroeste e Oeste
5 do estado do Paraná (terceiro planalto paranaense) e, estima-se que ao avançar sobre
6 a FOM, sua área será aumentada em 72%. Já a FOD, localizada na planície litorânea
7 e caracterizada pelo clima quente e úmido, com abundantes chuvas, não sofrerá
8 mudanças significativas com o aumento da temperatura global (WREGGE *et al.*, 2017).

9 Os Campos Gerais estão localizados no segundo planalto
10 paranaense, a uma altitude média muito elevada, com topos atingindo 1.290 metros
11 de altitude (MELO *et al.*, 2007). Eles apresentam uma fitofisionomia particular
12 combinando campos limpos e campos cerrados naturais com fragmentos de Florestas
13 Ombrófilas Mistas (MORO e CARMO, 2007; CARMO, MORO e NOGUEIRA, 2007;
14 RITTER, RIBEIRO e MORO, 2010). Isolados naturalmente pelas barreiras
15 geomorfológicas Escarpa Devoniana e Serra Geral, constituem um microhabitat único
16 (MELO, MORO e GUIMARÃES, 2007).

17 Ferreira *et al.* (2019) avaliaram a influência de variáveis ambientais na
18 estrutura populacional de cinco espécies arbóreas em fitofisionomias distintas, e
19 concluíram que há variações na densidade ao longo dessas fitofisionomias, portanto,
20 as populações se adaptam as diferentes condições microambientais. Isso
21 provavelmente se estende para a biodiversidade como um todo, incluindo os
22 invertebrados adaptados as regiões florestais.

23 Ainda pouco se sabe como as espécies de aranhas respondem as
24 fragmentações populacionais, sejam elas de origem antrópica ou não. O presente
25 estudo visa contribuir com novas informações a respeito da variabilidade genética a
26 nível de DNA dentro e entre populações de uma espécie de aracnídeo, a fim de
27 compreender quais os prováveis fatores que estão envolvidos na história evolutiva
28 desta espécie.

1 3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

2 Geral

3 O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a diversidade e a
4 estrutura genética de populações de *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880)
5 distribuídas em seis Unidades de Conservação no estado do Paraná, com base em
6 marcadores moleculares SNPs e COI, a fim de compreender como a variabilidade
7 genética se distribui nessas populações, bem como o impacto da fragmentação
8 populacional nesta variabilidade genética e os prováveis fatores envolvidos nesse
9 processo.

10 Específicos

- 11 • Estimar parâmetros de diversidade genética a partir dos marcadores SNPs,
12 a fim de compreender o padrão de diversidade nas populações de *E.*
13 *cyclothorax* analisadas no presente trabalho.
- 14 • Estimar a partir dos marcadores SNPs parâmetros de estrutura genética intra
15 e interpopulacionais de *E. cyclothorax*, a fim de verificar possível
16 diferenciação entre grupos genéticos.
- 17 • Avaliar divergência genética de sequências a partir do marcador mitocondrial
18 COI, a fim de verificar a possibilidade de espécies distintas no conjunto de
19 dados avaliados.
- 20 • Estimar tempo de divergência por meio de uma árvore de gene baseada no
21 mtDNA, a fim de datar a diversificação dos espécimes e assim mensurar
22 possíveis fatores envolvidos neste processo.
- 23 • Comparar as distâncias genéticas nucleares e geográficas das populações,
24 a fim de investigar presença ou não de fluxo gênico entre elas.
- 25 • Verificar se há barreiras genéticas associadas à geografia, a fim de
26 compreender se as distâncias geográficas também interferem na
27 diferenciação genética das populações.

1 **4 BIBLIOGRAFIA**

- 2 AKPINAR, A.; MAMMADOVA, R. Genetic Population Structures Based on the COI
3 Gene of *Bassaniodes pseudorectilineus* (Araneae: Thomisidae). **Entomological**
4 **News**, v. 129, n. 3, p. 217-229, oct. 2020. <https://doi.org/10.3157/021.129.0301>
- 5 ALBO, M. J.; BIDEGARAY-BATISTA, L.; BECHSGAARD, J.; SILVA, E. L. C. da;
6 BILDE, T.; PÉREZ-MILES, F. Molecular Phylogenetic Analyses Show that
7 Trechaleidae and Lycosidae are Sister Groups. **Arachnology**, v. 17, n. 4, p.
8 169–176, mar. 2017. <https://doi.org/10.13156/arac.2017.17.4.169>
- 9 ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations.
10 **Mammalia**. 189-197, dec. 2007. <https://doi.org/10.1515/MAMM.2007.038>
- 11 ARNEDO, M. A.; FERRÁNDEZ, M.-A. Mitochondrial markers reveal deep population
12 subdivision in the European protected spider *Macrothele calpeiana* (Walckenaer,
13 1805) (Araneae, Hexathelidae). **Conservation Genetics**, v. 8, n. 5, p. 1147–
14 1162, jan. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9270-2>
- 15 BALOGH, A.; NGO, L.; ZIGLER, K. S.; DIXON, G. Population genomics in two cave-
16 obligate invertebrates confirms extremely limited dispersal between caves.
17 **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17554, oct. 2020.
18 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74508-9>
- 19 BENAMÚ, M. A.; LACAVA, M.; GARCÍA, L. F.; SANTANA, M.; VIERA C. Spiders
20 Associated with Agroecosystems: Roles and Perspectives. In: VIERA, C.;
21 GONZAGA, M. O. **Behaviour and Ecology of Spiders. Contributions from**
22 **the Neotropical Region**. Switzerland: Springer, 2017. p. 275-302.
- 23 BERNARDI, L. F. O.; SPERANDEI, V. F.; AUDINO, L. D.; SENA, C. H.; ALVES, J. A.
24 Notes on the predation of an assassin bug by a spider in a Neotropical cave.
25 **Subterranean Biology**, v. 33, p. 17-22, jan. 2020. 10.3897/subtbiol.33.48292
- 26 BERTANI, R.; GODÉ L.; KURY A.; CÉLÉRIER M.-L. Aracnídeos (Arachnida) da
27 Reserva Biológica de Pedra Talhada. In: STUDER, A.; NUSBAUMER L.;
28 SPICHIGER R (Eds.). **Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra**
29 **Talhada (Alagoas, Pernambuco - Brasil)**. Boissiera 68: 175-191, jan. 2015.
- 30 BOAS JUNIOR, F. E. V.; FERREIRA, A. S.; SOUZA, M. M. de. The effect of
31 fragmentation on spider richness (Arachnida: Araneae) in montane
32 semideciduous seasonal forest. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre,
33 v.12, n. 4, p. 45-57, dez. 2020. [http://dx.doi.org/10.18406/2316-](http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v12n420201495)
34 [1817v12n420201495](http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v12n420201495)
- 35 BRESCOVIT, A. D.; OLIVEIRA, U. de; SANTOS, A. J. dos. Aranhas (Araneae,
36 Arachnida) do Estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e
37 estado do conhecimento. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 717-747. 2011.
- 38 BUCHERL, M. Revisão das espécies do gênero *Enoploctenus* Simon, 1897. **Men.**

- 1 **Inst. Butantan**, v. 23, p. 1-44, nov. 1950.
- 2 CARMO, M. R. B. do; MORO, R. S.; NOGUEIRA, M. K. F. de S. A vegetação
3 florestal nos Campos Gerais. *In*: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G.
4 B. **Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Editora
5 UEPG, 2007. Cap. 9, p.99-104.
- 6 CASTANHEIRA, P.; PÉREZ-GONZÁLEZ, A.; BAPTISTA, R L. C. Spider diversity
7 (Arachnida: Araneae) in Atlantic Forest areas at Pedra Branca State Park, Rio
8 de Janeiro, Brazil. **Biodiversity Data Journal**, v. 4, p. e7055, jan. 2016.
9 <https://doi.org/10.3897/BDJ.4.e7055>
- 10 CHANG, J.; SONG, D.; ZHOU, K. Incongruous nuclear and mitochondrial
11 phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa*
12 *astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. **Molecular Phylogenetics and**
13 **Evolution**, v. 42, n. 1, p. 104–121, jan. 2007
14 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.013>
- 15 CHAVARI, J. L.; CIPOLA, N. G.; BRESCOVIT, A. D. Records of Spiders (Arachnida:
16 Araneae) of the Parque Estadual Mata São Francisco, Paraná, Brazil. **Check**
17 **List**, v. 10, n. 6, p. 1435-1444, dec. 2014. <https://doi.org/10.15560/10.6.1435>
- 18 DEACON, A. E.; FARRELL, A. D.; FRASER, D. F. Observation of a semi-aquatic
19 spider attack: An overlooked fish predator in a well-studied ecosystem?. **Living**
20 **World, Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club**, p. 57-59,
21 dec. 2015.
- 22 DIAS, S. C.; CARVALHO, L. S.; BONALDO, A. B.; BRESCOVIT, A. D. Refining the
23 establishment of guilds in Neotropical spiders (Arachnida: Araneae). **Journal of**
24 **Natural History**, v. 44, n. 3–4, p. 219–239, jan. 2010.
25 <https://doi.org/10.1080/00222930903383503>
- 26 DIMASSI, N.; KHADRA, Y. B.; OTHMEN, A. B.; EZZINE, I. K.; SAID, K. High genetic
27 diversity vs. low genetic and morphological differentiation of *Argiope trifasciata*
28 (Araneae, Araneidae) in Tunisia. **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 1, p.
29 1–15. 2017. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1203040>
- 30 FERNÁNDEZ, R. *et al.* Phylogenomics, Diversification Dynamics, and Comparative
31 Transcriptomics across the Spider Tree of Life. **Current Biology**, v. 28, n. 9, p.
32 1489-1497, may. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.064>
- 33 FERREIRA, M. de S.; BARROS, B. C. D.; GONZAGA, A. P. D.; MACHADO, E. L. M.;
34 OTONI, T. J. O. Influência das variáveis ambientais na estrutura de cinco
35 populações arbóreas do cerrado na região central de Minas Gerais. **Nativa**, v. 7,
36 n. 4, p. 460-468, jul./ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v7i4.6852>
- 37 FLOREN, A.; DEELEMEN-REINHOLD, C. Diversity of arboreal spiders in primary
38 and disturbed tropical forests. **The Journal of Arachnology**, v. 33, n. 2, p. 323-
39 333, aug. 2005. <https://doi.org/10.1636/05-22.1>

- 1 FOELIX, R. **Biology of spiders**. New York: Oxford University Press, 2011.
- 2 FRANKHAN, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da**
3 **Conservação**. Tradução: Farias, M. R. F. I. P. Ribeirão Preto: Sociedade
4 Brasileira de Genética.
- 5 FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **RELATÓRIO ANUAL 2021**. São Paulo:
6 Fundação SOS Mata Atlântica, 2021.
- 7 FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. **Atlas dos Remanescentes Florestais**
8 **da Mata Atlântica: período 2019-2020 relatório técnico**. São Paulo: Fundação
9 SOS Mata Atlântica, 2021.
- 10 FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. **Atlas dos Remanescentes Florestais**
11 **da Mata Atlântica: período 2020-2021 relatório técnico**. São Paulo: Fundação
12 SOS Mata Atlântica, 2022.
- 13 GARRISON, N. L. *et al.* Spider phylogenomics: untangling the Spider Tree of Life.
14 **PeerJ**, v. 4, e1719, feb. 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.1719>
- 15 GONZAGA, M. O.; SANTOS, A. J.; JAPYASSÚ, H. F. **Ecologia e comportamento**
16 **de aranhas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2007.
- 17 GONZÁLEZ-TRUJILLO, R.; CORREA-RAMÍREZ, M. M.; RUIZ-SANCHEZ, E.;
18 SALINAS, E. M.; JIMÉNEZ, M. L.; GARCÍA-DE LEÓN, F. J. Pleistocene refugia
19 and their effects on the phylogeography and genetic structure of the wolf spider
20 *Pardosa sierra* (Araneae: Lycosidae) on the Baja California Peninsula. **Journal**
21 **of Arachnology**, v. 44, n. 3, p. 367-379. 2016.
22 <https://www.jstor.org/stable/24892353>
- 23 GRISWOLD, C. E.; RAMIREZ, M. J.; CODDINGTON, J. A.; PLATNICK, N. I. Atlas of
24 phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae:
25 Entelegynae) with comments on their phylogeny. **Proceedings of the california**
26 **academy of sciences**, v. 56, p. 1-324, oct. 2005.
- 27 GUEDES F. B.; SEEHUSEN S. E. **Pagamentos por serviços ambientais na Mata**
28 **Atlântica: lições aprendidas e desafios**. 2. ed. Brasília: MMA, 2011.
- 29 GUIMARÃES, G. B.; MELO, M. S.; GIANNINI, P. C. F.; MELEK, P. R. Geologia dos
30 Campos Gerais. *In*: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B.
31 **Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Editora
32 UEPG, 2007. Cap. 2, p.23-32.
- 33 HATAWAY, R. A.; REED, D. H.; NOONAN, B. P. Development of 10 microsatellite
34 loci in the wolf spider *Arctosa sancterosae* (Araneae: Lycosidae). **Conservation**
35 **Genetics Resources**, v. 3, n. 2, p. 271–273, apr. 2011.
36 <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9339-6>
- 37 HENRARD, A.; JOCQUÉ, R. Morphological and molecular evidence for new genera
38 in the Afrotropical Cteninae (Araneae, Ctenidae) complex. **Zoological Journal**

- 1 **of the Linnean Society**, oct. 2016. <https://doi.org/10.1111/zoj.12461>
- 2 INIESTA, L. F. M.; ÁZARA, L. N. de; SOUZA-SILVA, M.; FERREIRA, R. L.
3 Biodiversidade em sete cavernas no Parque Estadual do Sumidouro (Lagoa
4 Santa, MG). **Revista Brasileira de Espeleologia**, v. 2, n. 2, 18-a. 2012.
- 5 INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro**
6 **Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII –**
7 **Invertebrados**, 1. ed. Brasília: MMA, 2018.
- 8 JIYING, S.; XIUQIN, F.; GUANGXU, P.; ZHIGANG, Z.; HENGMEI, Y. Influence of
9 long-period pesticide force on genetic polymorphism of wolf spider *Pardosa*
10 *pseudoannulata* (Lycosidae: Araneae). **Progress in Natural Science**, v. 17, n.
11 10, oct. 2007.
- 12 JOCQUÉ, R.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A. S. **Spider Families of the World**.
13 Tervuren: ARC-PPRI, 2006.
- 14 JUNG, J.; LEE, J.-W.; KIM, J.-P.; KIM, W. Genetic variations of the golden orb-web
15 spider *Nephila clavata* (Araneae: Tetragnathidae) in Korea, using AFLP markers.
16 **Korean Journal of Genetics**, v. 28, n. 4, p. 325-332, dec. 2006.
- 17 KAHL, G.; MAST, A.; TOOKE, N.; SHEN, R.; BOOM, D. van den. Single nucleotide
18 polymorphisms: detection techniques and their potential for genotyping and
19 genome mapping. **The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and**
20 **Physical Mapping**, 75-107, jan. 2005. <https://doi.org/10.1002/3527603514.ch4>
- 21 KEITH, R.; HEDIN, M. Extreme mitochondrial population subdivision in southern
22 *Appalachian paleoendemic* spiders (Araneae: Hypochilidae: Hypochilus), with
23 implications for species delimitation. **The Journal of Arachnology**, v. 40, n. 2,
24 p. 167-181, aug. 2012. <https://doi.org/10.1636/A11-49.1>
- 25 LI, C.-C.; LI, G.-Y.; WANG, Y.; PENG, Y. Development of SSR markers based on
26 transcriptome sequences of the Wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae:
27 Lycosidae). **Entomological News**, v. 129, n. 1, p. 6-15, jan. 2020.
- 28 LIU, N.; CHEN, L.; WANG, S.; OH, C.; ZHAO, H. Comparison of single-nucleotide
29 polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. **BMC**
30 **Genetics**, v. 6, n. 1, p. 1-5, dec. 2005.
- 31 LUIKART, G.; ENGLAND, P. R.; TALLMON, D.; JORDAN, S.; TABERLET, P. The
32 power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.
33 **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 12, p. 981–994, dec. 2003.
34 <https://doi.org/10.1038/nrg1226>
- 35 LUIKART, G.; KARDOS, M.; HAND, B. K.; RAJORA, O. P.; AITKEN, S. N.;
36 HOHENLOHE, P. A. Population genomics: advancing understanding of nature.
37 In: RAJORA, O. P. **Population genomics**. Fredericton: Springer, 2018. p. 3-79.
- 38 MACRINI, C. M. T.; PERES, E. A.; SOLFERINI, V. N. Cryptic diversity of

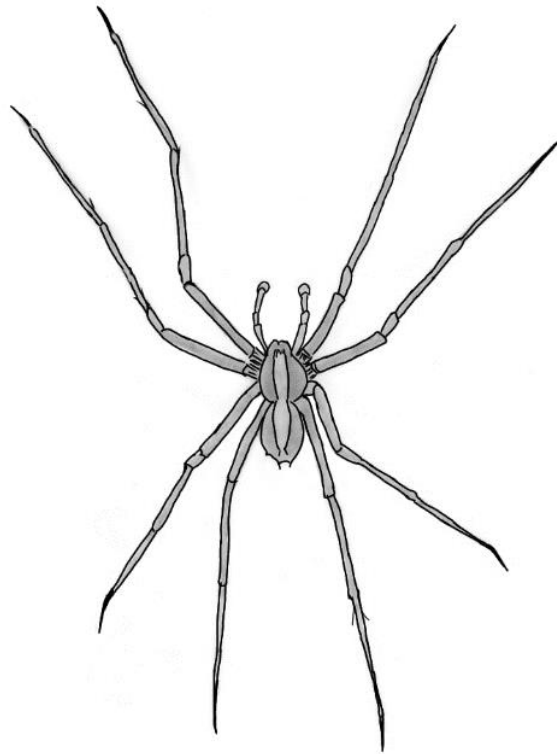
- 1 *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest:
2 evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. **Journal of**
3 **Applied Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 06, p. 009-014, nov-dec. 2015.
4 <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3602>
- 5 MAPBIOMAS (2022). DESTAQUES DO MAPEAMENTO ANUAL DA COBERTURA
6 E USO DA TERRA NO BRASIL DE 1985 A 2021: MATA ATLÂNTICA. São
7 Paulo: MapBiomias.
- 8 MAPBIOMAS ALERTA (2022). RAD 2021: RELATÓRIO ANUAL DO
9 DESMATAMENTO NO BRASIL. São Paulo: MapBiomias.
- 10 McGAVIN, G. C. **Smithsonian Handbooks Insects Spiders and Other Terrestrial**
11 **Arthropods**. New York: Covent Garden Books, 2009.
- 12 MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. Os Campos Gerais do Paraná. *In*:
13 MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. **Patrimônio natural dos**
14 **Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2007. Cap. 1, p. 17-
15 21.
- 16 MELO, M. S.; GUIMARÃES, G. B.; RAMOS, A. F.; PRIETO, C. C. Relevo e
17 hidrografia dos Campos Gerais. *In*: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES,
18 G. B. **Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa:
19 Editora UEPG, 2007. Cap. 4, p.49-58.
- 20 MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K.; SNPs workshop group. SNPs in
21 ecology, evolution and conservation. **TRENDS in ecology and evolution**, v. 19,
22 n. 4, p. 208-216, apr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- 23 MORO, R. S.; CARMO, M. R. B. do. A vegetação campestre nos Campos Gerais. *In*:
24 MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. **Patrimônio natural dos**
25 **Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2007. Cap. 8, p.93-
26 98.
- 27 NARUM, S. R.; BUERKLE, C. A.; DAVEY, J. W.; MILLER, M. R.; HOHENLOHE, P.
28 A. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics.
29 **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 2841–2847, jun. 2013.
30 <https://doi.org/10.1111/mec.12350>
- 31 NOGUEIRA, A. A.; VENTICINQUE, E. M.; BRESCOVIT, A. D.; LO-MAN-HUNG, N.
32 F.; CANDIANI, D. F. List of species of spiders (Arachnida, Araneae) from the
33 Pico da Neblina, state of Amazonas, Brazil. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1044–
34 1060, oct. 2014. <https://doi.org/10.15560/10.5.1044>
- 35 PARMAKELIS, A. *et al.* Development of 28 polymorphic microsatellite markers for the
36 endemic Azorean spider *Sancus acorensis* (Araneae, Tetragnathidae).
37 **Conservation Genetics Resources**, v. 5, n. 4, p. 1133–1134, jun. 2013.
38 <https://doi.org/10.1007/s12686-013-9976-7>
- 39 PARQUE ESTADUAL SERRA DO MAR. **Caderno-4-documento-sintese**. São

- 1 Paulo, 2015.
- 2 PEIGNEUR, S.; LIMA, M. E. de; TYTGAT, J. *Phoneutria nigriventer* venom: A
3 pharmacological treasure. **Toxicon**, v. 151, p. 96–110, sep. 2018.
4 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.008>
- 5 PEGAS, F. de V.; CASTLEY, J. G. Private reserves in Brazil: Distribution patterns,
6 logistical challenges, and conservation contributions. **Journal for Nature**
7 **Conservation**, v. 29, p. 14-24, feb. 2016.
8 <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2015.09.007>
- 9 PIACENTINI, L. N.; RAMÍREZ, M. J. Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the
10 wolf spiders (Araneae, Lycosidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.
11 136, p. 227–240, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.004>
- 12 PINTO, L. P., HIROTA, M. M. **30 anos da Conservação do Hotspot de**
13 **Biodiversidade Mata Atlântica: desafios, avanços e um olhar para o futuro.**
14 São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. 2022. 416 p.
- 15 PLATNICK, N. I. **Spiders of the world: a natural history.** Princeton: Princeton
16 University Press, 2020. 256 p.
- 17 POLOTOW, D.; BRESOVIT, A. D. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider
18 subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). **Zoological Journal of the**
19 **Linnean Society**, v. 170, n. 2, p. 333–361, feb. 2014.
20 <https://doi.org/10.1111/zoj.12101>
- 21 POLOTOW, D.; CARMICHAEL, A.; GRISWOLD, C. E. Total evidence analysis of the
22 phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae).
23 **Invertebrate Systematics**, v. 29, n. 2, p. 124-163, jun. 2015.
24 <https://doi.org/10.1071/IS14041>
- 25 POLOTOW, D.; BRESOVIT, A. D. *Kiekie*, a new Neotropical spider genus of
26 Ctenidae (Cteninae, Araneae). **Zootaxa**, v. 4531, n. 3, p. 353-373, dec. 2018.
27 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4531.3.2>
- 28 POSTIGLIONI, R.; BIDEGARAY-BATISTA, L.; SIMÓ, M.; ARNEDO, M. A. Move to
29 stay: genetic structure and demographic history of a wolf spider inhabiting
30 coastal sand dunes of southern South America. **Systematics and Biodiversity**,
31 London, v. 17, n. 7, p. 635–649, nov. 2019.
32 <https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1689197>
- 33 RAMIREZ, M. G.; CHI, B. Cryptic speciation, genetic diversity and gene flow in the
34 California turret spider *Atypoides riversi* (Araneae: Antrodiaetidae). **Biological**
35 **Journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 1, p. 27-37, may. 2004.
36 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00312.x>
- 37 REGO, F. N. A. A.; VENTICINQUE, E. M.; BRESOVIT, A. D. Densidades de
38 aranhas errantes (Ctenidae e Sparassidae, Araneae) em uma floresta
39 fragmentada. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1a. 2005.

- 1 REGO, F. N. A. A.; VENTICINQUE, E. M.; BRESCOVIT, A. D. Effects of forest
2 fragmentation on four *Ctenus* spider populations (Araneae: Ctenidae) in central
3 Amazonia, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 42, n.
4 2, p. 137–144, apr. 2007. <https://doi.org/10.1080/01650520600935082>
- 5 RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA,
6 M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining
7 forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v.
8 142, p. 1141-1153, jun. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- 9 RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e
10 fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR,
11 Brasil-limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379-414, set.
12 2010. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300034>
- 13 ROMERO, G. Q. Aranhas como agentes de controle biológico em agrossistemas. *In*:
14 GONZAGA, M. O.; SANTOS, A. J.; JAPYASSÚ, H. F. **Ecologia e**
15 **comportamento de aranhas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2007. p. 301-315.
- 16 ROWE, G.; SWEET, M.; BEEBEE, T. **An Introduction to Molecular Ecology**. 3. ed.
17 Oxford: Oxford University Press, 2017.
- 18 SALGADO-ROA, F. C.; PARDO-DIAZ, C.; LASSO, E.; ARIAS, C. F.; SOLFERINI, V.
19 N.; SALAZAR, C. Gene flow and Andean uplift shape the diversification of
20 *Gasteracantha cancriformis* (Araneae: Araneidae) in Northern South America.
21 **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 14, p. 7131–7142, jul. 2018.
22 <https://doi.org/10.1002/ece3.4237>
- 23 SALGADO-ROA, F. C.; GAMEZ, A.; SANCHEZ-HERRERA, M.; PARDO-DÍAZ, C.;
24 SALAZAR, C. Divergence promoted by the northern Andes in the giant fishing
25 spider *Ancylometes bogotensis* (Araneae: Ctenidae). **Biological Journal of the**
26 **Linnean Society**, v. 132, n. 3, p. 495-508, mar. 2021.
27 <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa220>
- 28 SANTOS, A. J.; BRESCOVIT, A. D.; JAPYASSÚ, H. F. Diversidade de aranhas:
29 sistemática, ecologia e inventário de fauna. *In*: GONZAGA, M. O.; SANTOS, A.
30 J.; JAPYASSÚ, H. F. **Ecologia e comportamento de aranhas**. Rio de Janeiro:
31 Interciência, 2007. p. 185-208.
- 32 SILVA DAVILA, D. HIGHER-LEVEL RELATIONSHIPS OF THE SPIDER FAMILY
33 CTENIDAE (ARANEAE: CTENOIDEA). **American Museum of Natural History**,
34 v. 274, p. 1–86, feb. 2003. [https://doi.org/10.1206/0003-](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2003)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2)
35 [0090\(2003\)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2003)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2)
- 36 SILVA-DÁVILA, D. Revisión del género de arañas *Caloctenus* Keyserling, 1877
37 (Araneae, Ctenidae). **Revista peruana de Biología**, v. 11, n. 1, p. 5-26, jul.
38 2004.
- 39 SIMON, E. **Histoire naturelle des araignées**. Paris: Imprimerie Édouard, 1897.

- 1 STEFANI, V.; DEL-CLARO, K. The effects of forest fragmentation on the population
2 ecology and natural history of a funnel-web spider. **Journal of Natural History**,
3 v. 49, n. 3–4, p. 211–231. 2015. <https://doi.org/10.1080/00222933.2014.909068>
- 4 TABARELLI, M.; AGUIAR, A. V.; RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P. A conversão da
5 floresta atlântica em paisagens antrópicas: lições para a conservação da
6 diversidade biológica das florestas tropicais. **Interciencia**, v. 37, n. 2, p. 88-92.
7 feb. 2012. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33922717002>
- 8 TANIKAWA, A.; SHINKAI, A.; TATSUTA, H.; MIYASHITA, T. Highly diversified
9 population structure of the spider *Lycosa ishikariana* inhabiting sandy beach
10 habitats. **Conservation genetics**, v. 19, n. 2, p. 255-263. 2018.
11 [10.1007/s10592-017-0996-9](https://doi.org/10.1007/s10592-017-0996-9)
- 12 TRAJANO, E. Biodiversity in South America. *In*: WHITE, W. B.; CULVER, D. C.;
13 PIPAN T. **Encyclopedia of Caves**. 3 ed. Cambridge: Academic Press, 2019. p.
14 177-186.
- 15 TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; GUZMAN, F.; SILVA-ARIAS, G. A.;
16 SPERB-LUDWIG, F.; VETO, N. M. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP):
17 metodologias de identificação, análise e aplicações. *In*: TURCHETTO-ZOLET,
18 A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores**
19 **moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto:
20 Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 132-179.
- 21 VANKHEDE, G.; HADOLE, P.; CHAKRAVARTHY, A. K. Spiders: Diversity,
22 Distribution, and Conservation. *In*: CHAKRAVARTHY, A. K.; SRIDHARA, S.
23 **Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics**.
24 Bengaluru: Springer, 2016. p. 139-164.
- 25 WATSON, J. E. M.; DUDLEY, N.; SEGAN, D. B.; HOCKINGS, M. The performance
26 and potential of protected areas. **Nature**, v. 515, p. 67-73, nov. 2014.
27 [doi:10.1038/nature13947](https://doi.org/10.1038/nature13947)
- 28 WILLEMART, R. H.; LACAVALA M. Foraging Strategies of Cursorial and Ambush
29 Spiders. *In*: VIERA, C.; GONZAGA, M. O. **Behaviour and Ecology of Spiders.**
30 **Contributions from the Neotropical Region**. Switzerland: Springer, 2017. p.
31 227-247.
- 32 WHEELER, W. C. *et al.* The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on
33 target-gene analyses from an extensive taxon sampling. **Cladistics**, v. 33, n. 6,
34 p. 574–616, dec. 2016. <https://doi.org/10.1111/cla.12182>
- 35 WREGG, M. S.; GARRASTAZU, M. C.; SOARES, M. T. S.; FRITZSONS, E.; de
36 SOUSA, V. A.; de AGUIAR, A. V. Principais fitofisionomias existentes no estado
37 do Paraná e os novos cenários definidos pelas mudanças climáticas globais.
38 **Ambiência, Guarapuava**, v. 13, n. 3, p. 600-615, set./dez. 2017.
39 [10.5935/ambiencia.2017.03.05](https://doi.org/10.5935/ambiencia.2017.03.05)
- 40 WWF - WORLD WIDE FUND FOR NATURE. **Unidades de conservação:**

- 1 **conservando a vida, os bens e os serviços ambientais.** São Paulo, 2008. 23
2 p.
- 3 ZEPON, T.; BICHUETTE, M. E. Influence of substrate on the richness and
4 composition of Neotropical cave fauna. **Anais da Academia Brasileira de**
5 **Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1615–1628, jul-sep. 2017. [https://doi.org/10.1590/0001-](https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160452)
6 3765201720160452
- 7 ZEQUI, J. A. C.; ORSI, M. L.; SOUZA-SHIBATTA, L. Fauna e flora do Parque
8 Estadual Mata São Francisco – Norte do Paraná. *In*: CIPOLA, N.; ZEQUI, J.;
9 CHAVARI, J. L.; BRESCOVIT, A. D. **Araneae (Arachnida)**. Londrina: Eduel,
10 2019. p. 63-104.
- 11 **BIBLIOGRAFIA ON-LINE**
- 12 **BirdLife International.** Disponível em: <https://www.birdlife.org/birds/>. Acesso em: 10
13 jan. 2023.
- 14 FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. (Eds.). **Eschmeyer's**
15 **catalog of fishes: genera, species, references.** Disponível em:
16 [http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp)
17 [asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp). Acesso em: 10 jan. 2023.
- 18 **Mammal Diversity Database.** Disponível em:
19 <http://doi.org/10.5281/zenodo.4139818>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- 20 **SOS Mata Atlântica.** Disponível em: [https://www.sosma.org.br/causas/areas-](https://www.sosma.org.br/causas/areas-protegidas/)
21 [protegidas/](https://www.sosma.org.br/causas/areas-protegidas/). Acesso em: 12 jan. 2023.
- 22 **SOS Mata Atlântica.** Disponível em: [https://www.sosma.org.br/conheca/mata-](https://www.sosma.org.br/conheca/mata-atlantica/)
23 [atlantica/](https://www.sosma.org.br/conheca/mata-atlantica/). Acesso em: 11 jan. 2023.
- 24 **SOS Mata Atlântica.** Disponível em: <https://www.sosma.org.br/sobre/quem-somos/>.
25 Acesso em: 11 jan. 2023.
- 26 **SpeciesLink network.** Disponível em: <https://specieslink.net/search/>. Acesso em: 10
27 jan. 2023.
- 28 **World Spider Catalog.** Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 13/03/2022.
29 doi: 10.24436/2. Acesso em: 10 jan. 2023.



5. CAPÍTULO 1

Dados genômicos identificam forte estruturação genética em *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae), revelando duas unidades taxonômicas distintas na região sul da Mata Atlântica brasileira

Será enviado para publicação na revista *Journal of Biogeography*

1 **Dados genômicos identificam forte estruturação genética em *Enoploctenus***
2 ***cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae), revelando duas unidades**
3 **taxonômicas distintas na região sul da Mata Atlântica brasileira**

4 Mariana Costa Terra¹, Antonio Domingos Brescovit², Rogério Fernandes de Souza³,
5 Ana Lúcia Dias¹, Matheus Pires Rincão⁴, Renata da Rosa¹

6 ¹ Laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular, Departamento de Biologia
7 Geral, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina
8 (UEL), Londrina, PR, Brasil

9 ² Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

10 ³ Laboratório de Bioinformática, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências
11 Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

12 ⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciência Biológicas - Campus Luiz
13 Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, PR,
14 Brasil

1

RESUMO

2 A fragmentação de habitats está entre as maiores ameaças aos aracnídeos presentes
3 nas florestas, principalmente em relação à *Enoploctenus cyclothorax* (Ctenidae), que
4 é caracterizada por hábitos preferencialmente arbóreos e cavernícolas e está
5 amplamente distribuída na Mata Atlântica do Sul e Sudeste do Brasil. Populações
6 fragmentadas, seja por fatores antrópicos ou estocásticos, tendem a estar mais
7 suscetíveis a extinção, uma vez que a diversidade genética é reduzida em populações
8 pequenas e isoladas. O presente trabalho teve como objetivo compreender como a
9 variabilidade genética se distribui em seis populações de *E. cyclothorax*, amostradas
10 em fragmentos de Mata Atlântica no Paraná, com base na genotipagem de
11 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs). Os resultados obtidos suportam a
12 separação de *E. cyclothorax* em dois grupos genéticos distintos no estado, baseado
13 principalmente em análises de estruturação genética e conectividade. Uma forte e
14 significativa estrutura genética foi observada na espécie, apoiada pelo $k = 3$ estimado
15 pela análise *bayesiana*, pelos altos valores de diferenciação genética F_{ST} e pelo baixo
16 fluxo gênico identificado entre os grupos genéticos. Corroborando com tais resultados,
17 evidenciou-se isolamento por distância e a presença de barreira genética nas
18 populações avaliadas. A análise genômica populacional também revelou uma
19 diversidade genética não homogênea em *E. cyclothorax* ($H_E = 0,14$ a $0,31$). A hipótese
20 de que a fragmentação populacional possivelmente impactaria a variabilidade
21 genética de *E. cyclothorax* ao longo do estado foi confirmada pelos dados inferidos,
22 que apontam a fitofisionomia, a distância geográfica e o desmatamento como fatores
23 que moldaram a atual estruturação genética identificada nas populações avaliadas.

24 **Palavras-chave:** aranhas, genética de populações, Paraná, SNPs, unidades de
25 conservação.

1 5.1 INTRODUÇÃO

2 No Brasil, ao longo dos anos, as paisagens foram se transformando e
3 florestas foram perdendo espaço para áreas antropizadas. Neste processo, um dos
4 biomas mais afetados foi a Mata Atlântica, atualmente considerada prioritária para
5 proteção e uma das florestas tropicais mais ricas do planeta, com altos índices de
6 biodiversidade e endemismo (Pinto & Hirota, 2022). Hoje restam apenas 12,4% da
7 área florestal original do bioma, distribuídos majoritariamente por 17 estados
8 brasileiros que, juntos, equivalem a 15% do território nacional (Fundação SOS Mata
9 Atlântica, 2021).

10 Ao longo da costa leste do país, várias formações florestais
11 constituem a Mata Atlântica, formando um mosaico de habitats naturais extremamente
12 heterogêneo (Ribeiro et al., 2011; Pinto & Hirota, 2022). As variações nos eixos
13 latitudinais, longitudinais e altitudinais conferem diferentes tipos de ambientes, com
14 diferentes fitofisionomias, assim, a extensa floresta atlântica pode ser observada
15 desde o nível do mar até grandes altitudes, estando presentes também nas regiões
16 interioranas. Esta diversidade de paisagens está relacionada com a rica diversidade
17 de espécies que existem neste bioma (Pinto & Hirota, 2022).

18 O desmatamento expõe ao perigo essa biodiversidade, uma vez que
19 a fragmentação de populações naturais pode colocar em risco a habilidade de
20 sobrevivência das mesmas (Frankhan, Ballou & Briscoe, 2008). O Paraná é um dos
21 estados brasileiros onde mais ocorre desmatamento, e o mosaico observado é
22 composto principalmente por pastagens e culturas agrícolas associadas aos
23 remanescentes florestais de Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE,
24 2022; MapBiomas, 2022). A fragmentação de habitats impacta significativamente a
25 araneofauna presente nas florestas e o desmatamento está entre as principais
26 ameaças responsáveis pela diminuição populacional destes invertebrados
27 (Vankhede, Hadole & Chakravarthy, 2016).

28 Dentre as espécies de aranha que habitam a Mata Atlântica,
29 *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880), uma espécie de Ctenidae, exerce um
30 importante papel ecológico considerando seu impacto predatório (Willemart & Kaneto,
31 2004). Uma variedade de artrópodes é predada por esta aranha caçadora (Willemart
32 & Kaneto, 2004) que atua, portanto, no controle populacional de insetos e de outras
33 presas, tal como a maioria das espécies desta ordem (Vankhede, Hadole &
34 Chakravarthy, 2016; Platnick, 2020). *Enoploctenus cyclothorax* possui hábitos
35 noturnos de caça e reprodução e utiliza, principalmente, fendas no solo e no tronco
36 de árvores caídas como refúgio durante o dia. As fêmeas são preferencialmente
37 arborícolas e permanecem estagnadas, enquanto os machos adultos têm maior
38 mobilidade sobre o substrato (Willemart & Kaneto, 2004). Registros de ocorrência
39 desta espécie se concentram na América do Sul, mais especificamente nas regiões
40 sul e sudeste do Brasil (SpeciesLink, 2022).

41 Poucos são os trabalhos que avaliam o impacto da fragmentação
42 populacional na variabilidade genética das populações de aranhas, sendo tais estudos
43 inexistentes para *E. cyclothorax*. Desta forma, estudos sobre o padrão de diversidade
44 genética, de estrutura genética e de fluxo gênico se fazem necessários para
45 compreensão do risco ao qual essas populações estão expostas.

46 Neste trabalho foram caracterizadas a diversidade e a estrutura
47 genética de *E. cyclothorax* em seis Unidades de Conservação no estado do Paraná,
48 Brasil, a partir de uma análise genômica baseada em marcadores de Polimorfismos
49 de Nucleotídeo Único (SNPs). As análises têm como propósito compreender como a

1 variabilidade genética se distribui nessas populações e quais os prováveis fatores que
 2 estão envolvidos na história evolutiva desta espécie.

3 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

4 5.2.1 Amostras e locais de coleta

5 Seis populações de *Enoploctenus cyclothorax* (20 indivíduos juvenis
 6 e adultos por população) foram coletadas em fragmentos florestais protegidos sob a
 7 forma de Unidades de Conservação (UCs), de diferentes regiões do estado do Paraná,
 8 Brasil (Fig. 1, Tab. 1). Os exemplares foram armazenados em álcool 70% e
 9 depositados na coleção aracnológica do Laboratório de Coleções Zoológicas do
 10 Instituto Butantan, em São Paulo/SP, Brasil (Tab. S1).

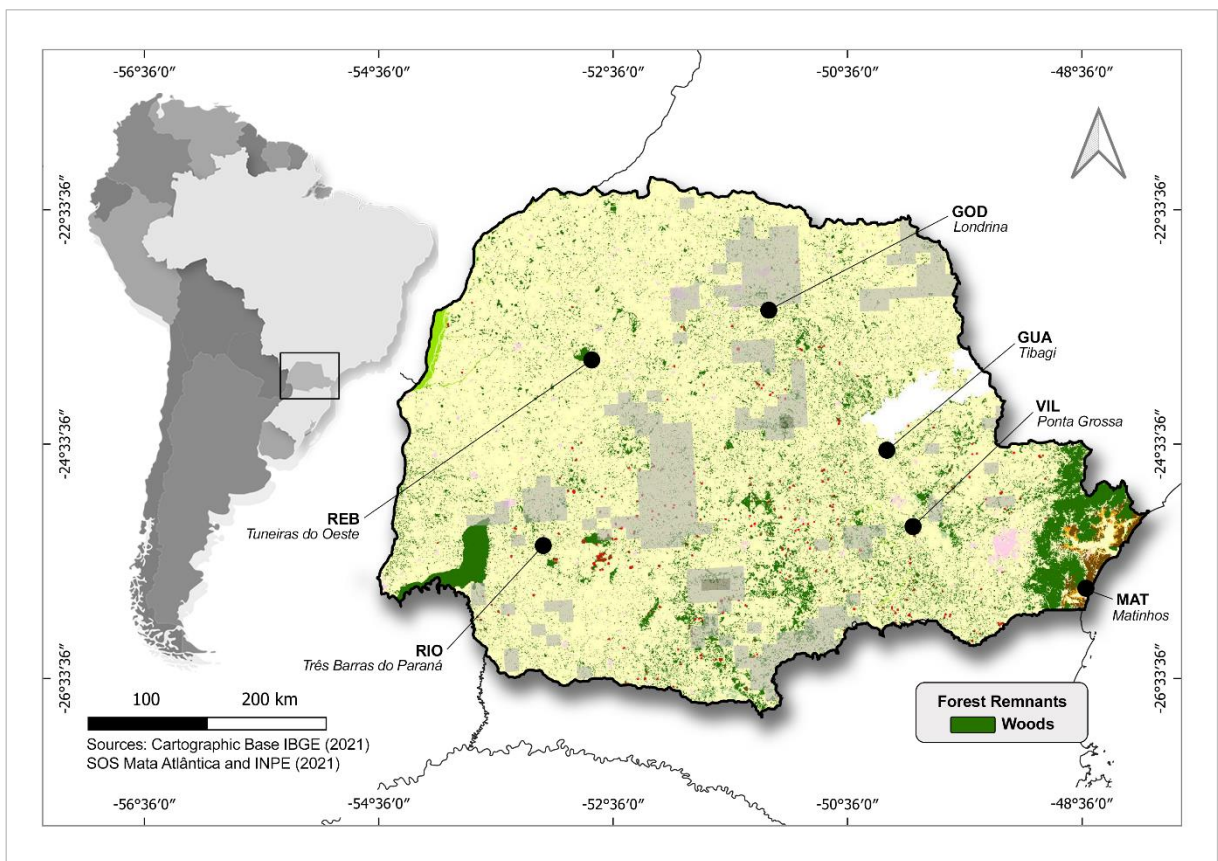


Figura 1 Localidades de coleta de *E. cyclothorax*, amostrados em Unidades de Conservação do estado do Paraná, Brasil, América do Sul (círculos pretos). Destaque para os remanescentes florestais de Mata Atlântica (ênfase em fragmentos de mata), apresentado pela Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (2020-2021). Mapa desenvolvido no programa QGIS v.3.16.16 (escala 1:250.000) e finalizado no programa Adobe Photoshop 2021.

Tabela 1 Caracterização dos locais de coleta e das populações de *E. cyclothorax*, amostradas em Unidades de Conservação no estado do Paraná, Brasil.

UCs	COD	Cidade	M	F	J	LAT	LONG
Parq. Est. Mata dos Godoy	GOD	Londrina	7	12	1	23° 26' 29,37"	51° 14' 31,86"
Parq. Est. Rio Guarani	RIO	Três Barras do Paraná	4	15	1	25° 26' 23,10"	53° 09' 32,80"
Res. Biol. das Perobas	REB	Tuneiras do Oeste	11	8	1	23° 51' 42,40"	52° 45' 07,80"
Parq. Est. do Quartelá	GUA	Tibagi	5	15	0	24° 36' 40,44"	50° 13' 30,78"
Parq. Est. de Vila Velha	VIL	Ponta Grossa	7	13	0	25° 15' 15,40"	50° 00' 11,30"
Parq. Nac. Saint-Hilaire-Lange	MAT	Matinhos	8	3	9	25° 48' 47,20"	48° 33' 25,10"

UCs: Unidades de Conservação; Parq.: Parque; Est.: Estadual; Nac.: Nacional; Res.: Reserva; Biol.: Biológica; COD: código de identificação da população; M: machos coletados; F: fêmeas coletadas; J: juvenis coletados; LAT: latitude; LONG: longitude.

1 5.2.2 Caracterização das Unidades de Conservação

2 No estado do Paraná existem cerca de 99 UCs, que são
 3 categorizadas em Unidades de Conservação de Proteção Integral e Unidades de
 4 Conservação de Uso Sustentável (IAT, 2022). A escolha das UCs foi realizada
 5 considerando-se o tamanho relativamente grande de área (próximo de 1.000 ha, ou
 6 mais) e a distribuição por diferentes regiões do estado. Os Parques Estaduais GOD e
 7 GUA representam as UCs com menores áreas, enquanto MAT exhibe uma área muito
 8 superior a todas as outras UCs aqui avaliadas, como observado na Tabela 2 (IAT,
 9 2022; Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade | Parna de Saint-
 10 Hilaire-Lange, 2022).

11 Várias matrizes agrícolas são observadas no entorno das UCs e, em
 12 alguns casos, estão associadas a uma matriz urbana, como em GOD, VIL, RIO e REB.
 13 Nas proximidades de GUA também observam-se muitas matrizes agrícolas e, desta
 14 forma, as UCs acabam sofrendo uma pressão antrópica muito grande, resultando no
 15 isolamento das mesmas. Em contraste, MAT exhibe uma extensa área de floresta, com
 16 algumas matrizes agrícolas ao redor, além de uma pedreira na margem do parque
 17 (Google Earth, 2022). Situada na Serra do Mar paranaense, esta UC abrange quatro
 18 municípios, constituindo um dos trechos mais preservados do bioma Mata Atlântica
 19 (Parque Nacional de Saint-Hilaire/Lange | Serra da Prata, 2022).

20 Diferentes formações florestais constituem a Mata Atlântica (Pinto &
 21 Hirota, 2022) e, neste trabalho, há exemplares representantes das Florestas
 22 Estacional Semidecidual, Ombrófila Mista, Ombrófila Densa e Campos Gerais, como
 23 mostrado na Tabela 2. Ao longo do gradiente florestal observado no Paraná tem-se a
 24 Floresta Estacional Semidecidual ao Norte, Noroeste e Oeste, caracterizada pela
 25 perda parcial de suas folhas, reduzindo a transpiração e aumentando a penetração de
 26 luz solar, e as Florestas Ombrófilas ao Leste que, por sua vez, mantêm
 27 permanentemente suas folhagens (Pereira, 2009; Fundação SOS Mata Atlântica &
 28 INPE, 2022). Considerando essas diferentes formações florestais e o relevo, as UCs
 29 GOD, RIO e REB compartilham as mesmas características. Por outro lado, GUA e VIL

1 apesar de presentes no mesmo planalto paranaense, exibem vegetações distintas.
 2 Por fim, MAT encontra-se na Planície litorânea do estado, limitada pela Serra do Mar,
 3 escarpa que se eleva a centenas de metros de altitude proporcionando densos
 4 nevoeiros e abundantes chuvas. Tal característica confere a essa região uma
 5 formação florestal única, as Florestas Ombrófilas Densas (Pereira, 2009).

Tabela 2 Caracterização das Unidades de Conservação avaliadas no presente trabalho, considerando tamanho de área, relevo e vegetação.

UCs	COD	Área (ha)	Relevo	Vegetação
Parq. Est. Mata dos Godoy	GOD	690,1756	3º Planalto	Estacional Semidecidual
Parq. Est. Rio Guarani	RIO	2.235,00	3º Planalto	Estacional Semidecidual
Res. Biol. das Perobas	REB	8.716,13	3º Planalto	Estacional Semidecidual
Parq. Est. do Guartelá	GUA	798,97	2º Planalto	Ombrófila Mista
Parq. Est. de Vila Velha	VIL	3.122,11	2º Planalto	Campos Gerais
Parq. Nac. Saint-Hilaire-Lange	MAT	24.485,711	Planície Litorânea	Ombrófila Densa

UCs: Unidades de Conservação; Parq.: Parque; Est.: Estadual; Nac.: Nacional; Res.: Reserva; Biol.: Biológica; COD: código de identificação da população; ha: hectares. Fonte: IAT, 2022.

6 5.2.3 Extração de DNA, Preparação e Sequenciamento das Bibliotecas Genômicas

7 O DNA genômico total foi extraído a partir de amostras de tecido das
 8 pernas dos exemplares, seguindo o protocolo com fenol-clorofórmio proposto por
 9 Almeida, Fungaro & Sodré (2001), com modificações. A integridade do DNA extraído
 10 foi confirmada por gel de agarose 1,5%, a concentração foi verificada por NanoDrop
 11 e confirmada por Qubit. Por fim, o DNA foi diluído a 20 ng/ L.

12 As bibliotecas genômicas foram preparadas pela empresa EcoMol
 13 Consultoria e Projetos Ltda (Piracicaba/SP), de acordo com o método de
 14 Genotipagem por Sequenciamento (GBS) descrito por Elshire et al. (2011). A redução
 15 da complexidade genômica do DNA total das amostras foi realizada por meio da
 16 enzima de restrição *Pst*I.

17 Cada amostra recebeu um adaptador com sequências *barcodes*
 18 (identificação dos indivíduos) e um adaptador de sequência comum, para amplificação
 19 dos fragmentos de restrição gerados. As bibliotecas foram unidas em um único *pool*,
 20 que foi encaminhado para o Centro de Genômica da ESALQ/USP. O sequenciamento
 21 da biblioteca final ocorreu em uma *lane* da plataforma HiSeq 2500 Illumina (Illumina,
 22 Inc, San Diego, CA), corrida *single-end*, produzindo leituras de 101 pares de base.

23 5.2.4 Processamento dos Dados

24 Para avaliar a qualidade das sequências brutas obtidas, foi utilizado o
 25 programa FastQC v.0.11.3 (Andrews, 2010). A descoberta de SNPs foi realizada por
 26 meio do *pipeline* Stacks v.2.58 (Catchen, Amores, Hohenlohe, Cresko & Postlethwait,
 27 2011; Catchen, Hohenlohe, Bassham, Amores & Cresko, 2013).

28 Na ausência de um genoma de referência para *E. cyclothorax*, uma

1 análise *de novo* foi executada no Stacks. No módulo *process_radtags* as leituras foram
2 demultiplexadas e filtradas. Foi utilizado o módulo *ustacks* para montagem *de novo*
3 dos *loci*, com a seguinte configuração de filtragem: -m 3, -M 2, -N 4. Posteriormente,
4 um catálogo de *loci* foi construído utilizando o módulo *cstacks* (-n 4). Todas as
5 amostras foram comparadas com o catálogo usando o módulo *sstacks*, para
6 determinar o conjunto de *loci* em cada uma. Por fim, no módulo *populations* uma série
7 de filtragens a nível populacional foram feitas, mantendo apenas um SNP por *locus* (-
8 -write-single-snp), presente em pelo menos 80% dos indivíduos de cada população (-
9 -r 0.80) e em todas as populações (-- p 6), com frequência alélica mínima $\geq 0,01$ (--
10 min-maf 0.01).

11 Esta configuração de filtragem foi selecionada considerando máxima
12 criteriosidade na escolha dos parâmetros, visando a qualidade dos marcadores SNPs
13 retidos no arquivo de saída.

14 5.2.5 Análise de Diversidade Genética

15 As estimativas de diversidade genética foram obtidas com o programa
16 Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), a partir de 10.000 permutações. O
17 programa Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) foi utilizado para o teste de Equilíbrio de
18 Hardy-Weinberg e o *U-test*, para verificar excesso e déficit de heterozigotos,
19 consecutivamente. Para isso, foram utilizadas 10.000 iterações de cadeia Markov e
20 Monte Carlo (MCMC).

21 5.2.6 Análise de Estrutura Genética e Conectividade

22 Para testar a hipótese sobre a presença de grupos genéticos, foi
23 utilizado o programa Structure v.2.3.4 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). As
24 corridas foram realizadas utilizando *popflag*, modelo *admixture* e frequências alélicas
25 correlacionadas, para K variando de 1 a 9, com 20 iterações, cada uma com 500.000
26 simulações para as cadeias Markov e Monte Carlo (MCMC) e descarte inicial das
27 100.000 primeiras iterações (*burn-in*).

28 A estimativa do valor de K mais provável foi realizada aplicando o
29 método *Puechmaille* (2016), por meio da ferramenta *online* Structure Selector
30 (<https://lme.qdio.ac.cn/StructureSelector/>). O gráfico sumarizado com as 20 réplicas
31 do K ótimo foi visualizado com o pacote *online* CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015).

32 A Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi realizada no programa
33 Arlequin, a partir de 10.000 permutações e 0,05 de nível significativo, avaliando dois
34 cenários: considerando um único grupo e, posteriormente, considerando três grupos.

35 Para testar as hipóteses sobre conectividade/fluxo gênico e influência
36 das distâncias geográficas na diferenciação genética populacional, foi realizada uma
37 rede de conexões no programa EDENetworks v.2.18 (Kivelä, Arnaud-Haond &
38 Saramaki, 2014) e o Teste de Mantel no programa Arlequin, a partir de 10.000
39 iterações. Por fim, foi utilizado o programa Barrier v.2.2 (Manni & Guérard, 2004) para
40 identificação de prováveis barreiras genéticas.

1 5.3 RESULTADOS

2 5.3.1 Identificação de SNPs

3 As bibliotecas GBS foram sequenciadas para 120 exemplares de *E.*
4 *cyclothorax*, totalizando 293.039.038 leituras brutas (*reads*). Após a demultiplexagem,
5 a filtragem do controle de qualidade e a remoção das leituras contendo sequências
6 adaptadoras ou códigos de barras ambíguos, o número total de leituras brutas retidas
7 foi 245.577.013. Considerando a média de leituras brutas retidas por indivíduo
8 (2.046.475,108 leituras), seis indivíduos foram descartados por apresentarem um
9 número muito inferior de leituras (17 a 5.742 leituras), restando 114 indivíduos para
10 as análises populacionais subseqüentes (Tab. S2).

11 Foram identificados nas populações um total de 372.903 *loci*
12 genotipados. Deste total, 369.020 *loci* foram removidos pois não passaram nas
13 restrições atribuídas pelo último módulo (*populations*), permanecendo no final 3.883
14 *loci* e 3.319 SNPs bialélicos, os quais foram utilizados para caracterizar a diversidade
15 e a estrutura genômica das populações de *E. cyclothorax* (profundidade média de
16 cobertura por amostra variando de 6,80 à 45,11 leituras por loco).

17 Para os 3.319 polimorfismos identificados, esta espécie apresentou
18 mais transversões (A – C; A – T; C – A; C – G; G – C; G – T; T – A; T – G) do que
19 transições (A – G; C – T; G – A; T – C). Porém, considerando o número total de sítios
20 polimórficos, as mutações mais frequentes foram as transições C – T (681 *loci*) e G –
21 A (628 *loci*) (Tab. S3).

22 5.3.2 Diversidade Genética

23 As estimativas de diversidade genética variaram entre as populações
24 de *E. cyclothorax* e, em todas elas, houve diferenças entre as médias de
25 heterozigosidade observada (H_O) e as médias de heterozigosidade esperada (H_E) sob
26 Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores de H_E variaram de 0,14 (MAT) a 0,31 (VIL)
27 e os valores de H_O variaram de 0,02 (GUA) a 0,29 (VIL) (Tab. 3).

28 Os níveis de diversidade genética (H_E) entre as populações das
29 florestas Estacionais Semidecíduais foram semelhantes, variando de 0,23 (REB) a
30 0,26 (RIO). Por sua vez, para a região de Ombrófila Mista (GUA) H_E foi de 0,29, para
31 a de Campos Gerais (VIL) 0,31 e apenas 0,14 para a de Ombrófila densa (MAT). Com
32 relação ao componente H_O , as populações GOD, GUA e MAT apresentaram os
33 menores níveis de heterozigosidade observada (0,15, 0,02 e 0,04, respectivamente).
34 Vale a pena ressaltar que GOD e GUA representam as menores UCs estudadas
35 (690,18 e 798,97 ha, respectivamente), enquanto MAT é a maior delas (24.485,71 ha).

36 A população GOD não apresentou alelos privados (A_P), seguido por
37 RIO (2) e REB (1) apresentando os menores números de sítios privados. Em
38 contrapartida, a população VIL apresentou um número muito superior de alelos
39 privados (82) em relação às demais populações. Todas as estimativas de diversidade
40 genômica para os *loci* analisados são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 Estimativas de diversidade genômica encontradas em populações de *E. cyclothorax* coletadas em Unidades de Conservação ao longo do estado do Paraná. Os índices de diversidade são mostrados apenas para *loci* polimórficos.

Pop	N	N _{LP}	A _P	H _o	s.d.	H _E	s.d.	F _{IS}
GOD	20	453	0	0,15	0,10	0,25	0,09	0,42*
RIO	19	539	2	0,25	0,18	0,26	0,16	0,01
REB	20	148	1	0,21	0,19	0,23	0,16	0,04
GUA	20	2.473	16	0,02	0,07	0,29	0,08	0,91*
VIL	19	265	82	0,29	0,19	0,31	0,16	0,04
MAT	16	1.059	6	0,04	0,11	0,14	0,09	0,70*

Pop: código das populações; N: Número de indivíduos genotipados; N_{LP}: número de *loci* polimórficos; A_P: número de alelos privados; H_o: heterozigosidade média observada; H_E: heterozigosidade média esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; s.d.: desvio padrão; F_{IS}: coeficiente de endogamia (* significativo). Populações analisadas: Parque Estadual Mata dos Godoy – Londrina (GOD); Parque Estadual do Guartelá – Tibagi (GUA); Parque Estadual de Vila Velha – Ponta Grossa (VIL); Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange – Matinhos (MAT); Parque Estadual Rio Guarani – Três Barras do Paraná (RIO) e Reserva Biológica das Perobas – Tuneiras do Oeste (REB).

1 Para o teste do modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg o resultado
 2 foi significativo para todas as populações ($p < 0,001$), enquanto para o *U-test* todos os
 3 resultados não foram significativos ($p = 1.0000$). Ou seja, há uma deficiência de
 4 heterozigotos em relação ao que esperaríamos encontrar, indicando que as
 5 populações não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tab. S4).

6 5.3.3 Estrutura Genética

7 A análise *bayesiana* de estruturação genética apontou um número
 8 mais provável de *clusters* (K) igual a três para os *loci* avaliados (Fig. S1), de acordo
 9 com o método de *Puechmaille* (2016), revelando uma forte estruturação entre as
 10 populações de *E. cyclothorax* analisadas (Fig. 2). Das 20 simulações para um K igual
 11 a 3, obtiveram-se 20 concordâncias nos agrupamentos havendo, portanto, uma
 12 convergência das corridas (Fig. S2).

13 O resultado desta análise mostrou uma clara diferença genética entre
 14 dois grandes grupos, um formado pelas amostras das populações GOD, RIO e REB
 15 (ao Norte, Noroeste e Oeste do estado do Paraná) e um formado pelas amostras das
 16 populações GUA, VIL e MAT (ao Leste, incluindo a região litorânea, do estado do
 17 Paraná), como observado na Figura 2.

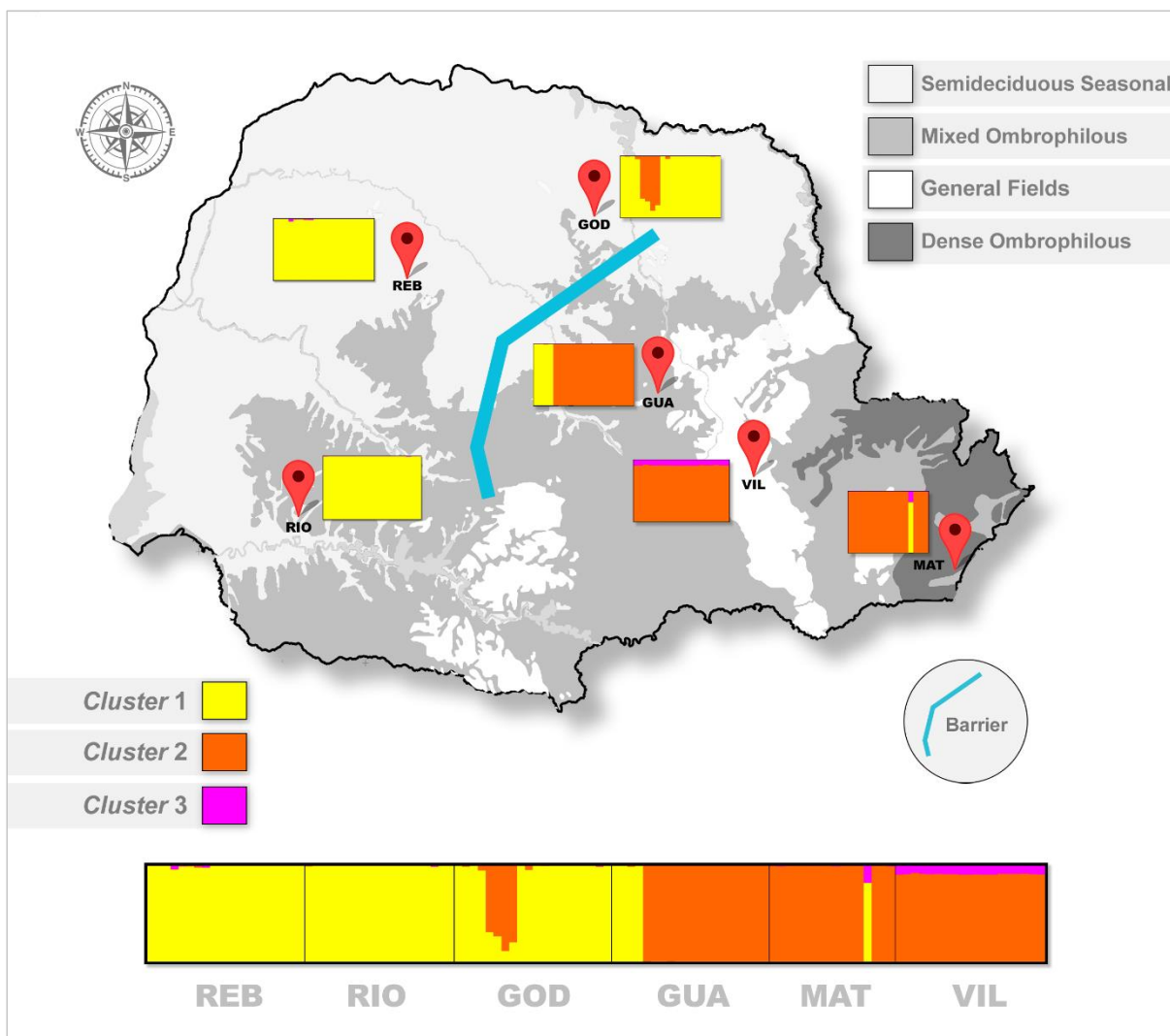


Figura 2 Agrupamento bayesiano resultante do programa Structure, evidenciando três grupos genéticos (*clusters*) que representam as seis populações de *E. cyclothorax* ao longo estado do Paraná ($K = 3$). As populações GOD, RIO e REB encontram-se na região fitogeográfica Floresta Estacional Semidecidual, enquanto GUA, VIL e REB encontram-se nas Florestas Ombrófila Mista, Campos Gerais e Ombrófila Densa, consecutivamente. Em azul, barreira genética detectada pelo programa Barrier (*bootstrapping* = 1). Observe que a constituição genética dos indivíduos pertencentes as populações do Norte e Oeste (GOD, RIO e REB) é distinta dos indivíduos pertencentes as populações do Leste (GUA, VIL e MAT), com pouca mistura entre esses dois grandes grupos. Esta forte estruturação genética identificada indica baixo fluxo gênico entre os grupos. Imagem finalizada no programa Adobe Photoshop 2021.

- 1 Os indivíduos das populações RIO e REB são majoritariamente
- 2 compostos por um único *cluster* (*cluster 1*, em amarelo). A população GOD apresentou
- 3 uma mistura de grupos genéticos, com indivíduos compostos pelo *cluster 1* e também
- 4 pelo *cluster 2* (em laranja). A população GUA também exibiu esses dois *clusters*,
- 5 porém, os indivíduos são compostos majoritariamente por um ou pelo outro *cluster*.
- 6 A população MAT apresentou uma clara diferença na constituição
- 7 genética em relação às populações anteriormente mencionadas, com indivíduos
- 8 compostos majoritariamente pelo *cluster 2*, em laranja (exceto um indivíduo composto
- 9 pelos *clusters 1* e 3). A população VIL apresentou uma constituição genética diferente
- 10 de todas as outras populações analisadas, apesar de estar relacionada com as
- 11 populações GUA e MAT, pois apresentam indivíduos majoritariamente compostos

1 pelo *cluster 2*, pode-se observar um terceiro *cluster* na população (em rosa),
 2 constituindo uma pequena fração da composição genética dos indivíduos (Fig. 2).

3 A AMOVA frente ao primeiro cenário de um único grupo, também
 4 apontou uma estrutura genética alta e significativa ($p < 0,0001$), com forte
 5 diferenciação genética entre as populações geográficas (F_{ST} global = 0,70) e dentre
 6 todos os indivíduos ($F_{IT} = 0,86$).

7 De acordo com o F_{ST} entre pares de população, a maioria das
 8 populações mostraram diferença genética significativa entre elas, exceto quando
 9 comparadas as populações GUA e MAT. As populações VIL e MAT exibiram os
 10 valores mais elevados de F_{ST} par a par (0,92 e 0,87 respectivamente) quando
 11 comparadas com RIO e REB, sugerindo uma alta diferenciação genética populacional
 12 entre elas. O coeficiente de diferenciação par a par mais baixo (0,01), foi observado
 13 entre as populações RIO e REB mas, apesar de baixo, foi significativo (Tab. 4). Esta
 14 análise corrobora com o resultado observado no Structure (Fig. 2), com valores F_{ST}
 15 par a par mais elevados quando comparadas as populações GOD, RIO e REB com as
 16 populações GUA, VIL e MAT (Fig. 3).

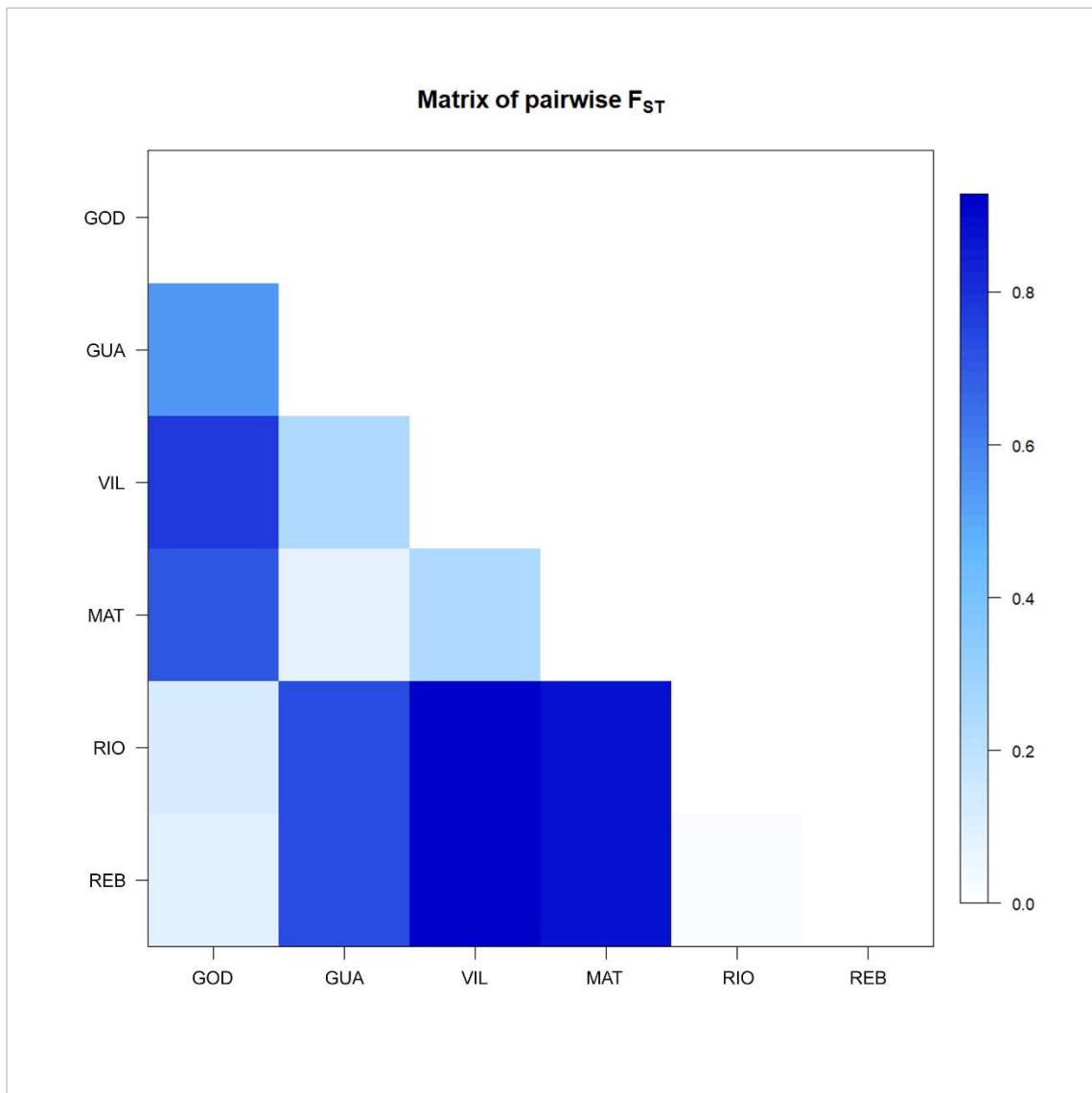


Figura 3 Mapa de calor com a representação gráfica dos coeficientes de diferenciação par a par (F_{ST})

gerado no programa Arlequin. Quanto mais claro o tom de azul, menor é a divergência genética entre as populações comparadas, e quanto mais forte o tom de azul, maior é a divergência genética entre as diferentes populações comparadas. Em branco, não há diferenciação genética, uma vez que a população está sendo comparada com ela mesma.

Tabela 4 Valores de F_{ST} entre pares de populações de *E. cyclothorax*.

	GOD	GUA	VIL	MAT	RIO	REB
GOD	0,00000					
GUA	0,54090	0,00000				
VIL	0,78276	0,23595	0,00000			
MAT	0,69903	0,07851*	0,23407	0,00000		
RIO	0,12249	0,73496	0,92783	0,87288	0,00000	
REB	0,09460	0,72807	0,92727	0,87125	0,01935	0,00000

* Coeficiente de diferenciação par a par não significativo ($p > 0,05$).

1 Recalculando as estatísticas F de acordo com o segundo cenário,
 2 onde as populações foram distribuídas em 3 grupos (Grupo 1: GOD, RIO e REB;
 3 Grupo 2: GUA e MAT; Grupo 3: VIL), o resultado da AMOVA também demonstrou
 4 evidência de alta e significativa estruturação genética dentre todos os indivíduos (F_{IT}
 5 = 0,89; $p < 0,0001$) e entre os grupos (F_{CT} = 0,74; $p = 0,01$). Já a diferenciação genética
 6 entre as populações dentro de cada grupo foi bem mais baixa (F_{SC} = 0,08), porém,
 7 significativa ($p = 0,02$).

8 O coeficiente de endogamia (F_{IS}) global foi significativo (0,54; $p <$
 9 0,0001) porém, ao estimar o coeficiente de endogamia entre indivíduos dentro das
 10 populações, observou-se que as populações GUA, MAT e GOD apresentaram os
 11 maiores valores (0,91; 0,70 e 0,42), sendo todos significativos ($p < 0,05$). As
 12 populações VIL, REB e RIO apresentaram os menores valores (0,04; 0,04 e 0,01),
 13 todos não significativos (Tab. 3).

14 A análise para inferir a conectividade entre as populações, baseada
 15 na matriz de distância genética e nas coordenadas geográficas, indicou duas rotas
 16 migratórias principais (Fig. 4). Na rede de *network* as populações são conectadas por
 17 *links* que representam a distância genética entre elas, e nela observam-se dois
 18 grandes grupos, havendo maior conectividade entre as localidades GUA, VIL e MAT,
 19 assim como entre as localidades GOD, REB e RIO, sugerindo maior fluxo gênico
 20 dentro desses dois grandes grupos e um fluxo gênico reduzido entre eles (Fig. 4).

21 As populações GUA e GOD apresentaram os maiores valores de
 22 Centralidade de Intermediação (*Betweenness centrality*), exibindo papel fundamental
 23 na conectividade das populações aqui analisadas. Todas as populações estavam
 24 dentro do limiar de distância (*thresholding* = 0,52).

25 O Teste de Mantel revelou um coeficiente de determinação de 32%
 26 ($r^2 = 0,32$) e um p-valor de 0,02 significativo ($p < 0,05$), evidenciando isolamento por
 27 distância. Por fim, uma barreira genética associada a geografia foi identificada na
 28 análise realizada no programa Barrier, com suporte estatístico igual a 1
 29 (*bootstrapping*). Esta barreira localiza-se entre as populações GOD, RIO, REB e GUA,
 30 VIL, MAT (Fig. 2, em azul), confirmando mais uma vez os agrupamentos estruturados
 31 identificados nas outras análises.

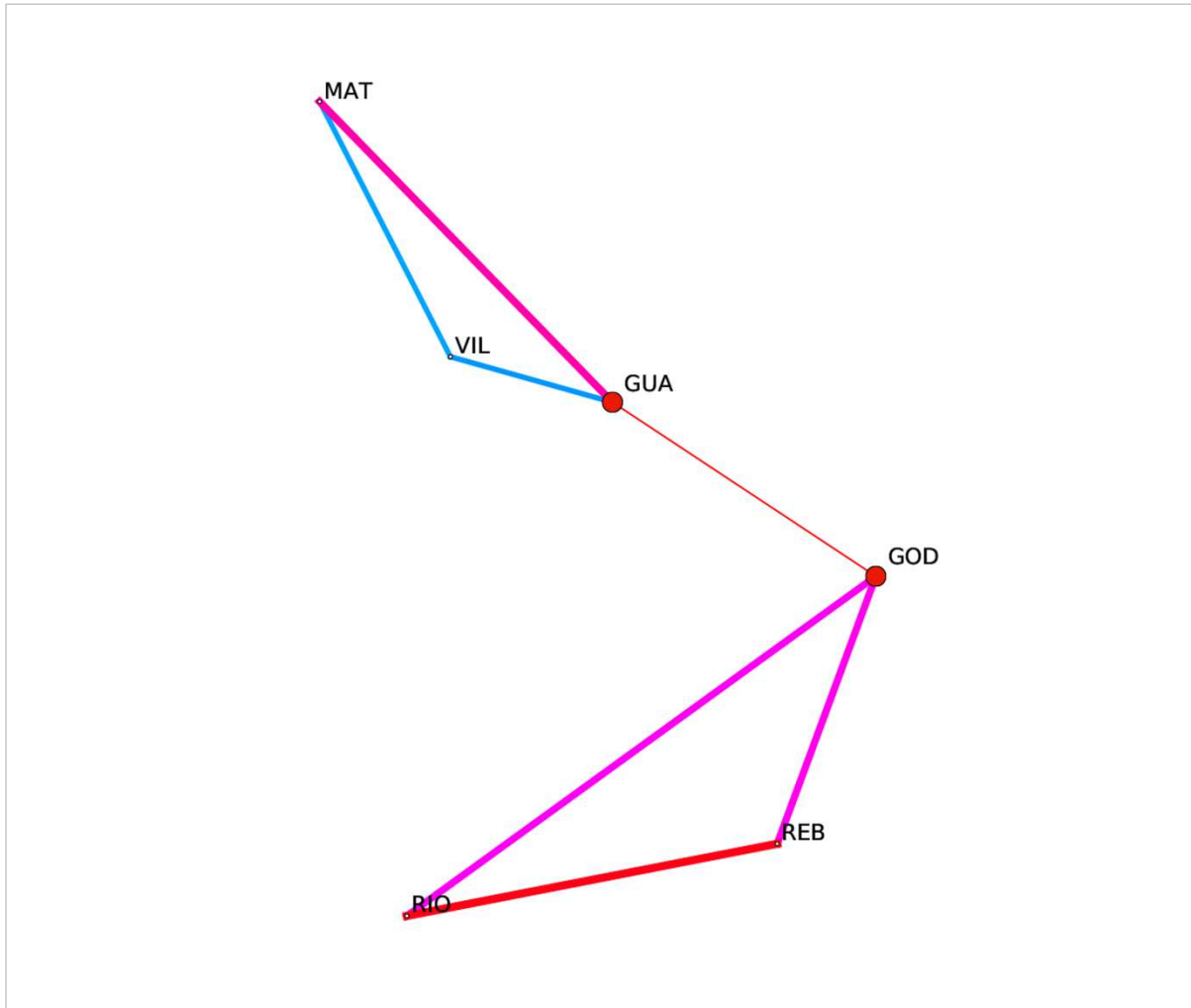


Figura 4 Rede de conectividade baseada na matriz de distância genética (F_{ST} par a par) gerada no programa Arlequin, e na matriz de distância geográfica (coordenadas geográficas). Nesta rede, as populações são conectadas por *links* (linhas) que representam a distância genética entre elas. Desta forma, quanto mais espesso for o *link*, menor é a distância genética entre as populações. Os círculos vermelhos representam as populações com os maiores valores de Centralidade de Intermediação, e a relação das cores dos *links* foi determinada aleatoriamente pelo programa.

1 5.4 DISCUSSÃO

2 O presente estudo traz os primeiros dados genéticos populacionais
 3 para *Enoploctenus cyclothorax* e ressaltam a necessidade de uma revisão minuciosa
 4 na espécie. A análise genômica populacional, realizada a partir de marcadores SNPs,
 5 revelou uma diversidade genética não homogênea e uma estruturação genética muito
 6 forte nessa espécie, indicando a existência de dois grupos genéticos distintos ao longo
 7 das formações florestais no estado do Paraná.

8 Avaliar índices de diversidade genética como altos ou baixos é
 9 bastante relativo e depende muito do organismo em estudo. Os valores de H_E
 10 disponíveis na literatura, observados em populações de espécies de aranhas
 11 relativamente próximas de *Enoploctenus*, variaram de 0,12 a 0,84. Esses valores
 12 foram observados em populações de *Arctosa sancterosae* Gertsch & Wallace, 1935
 13 ($H_E = 0,12$ a $0,44$), *Aglaoctenus lagotis* (Holmberg, 1876) ($H_E = 0,39$ a $0,63$), *Pardosa*
 14 *sierra* Banks, 1898 ($H_E = 0,81$ a $0,84$) e *Lycosa ishikariana* (Saito, 1934) (média $H_E =$

1 0,13), a partir de *loci* microssatélites, e representam a diversidade genética
2 encontrada em Lycosidae (Hataway, Reed & Noonan, 2011; Macrini, Peres & Solferini,
3 2015; González-Trujillo et al., 2016; Tanikawa et al., 2018), que pertence a mesma
4 superfamília de Ctenidae, Lycosoidea (Wheeler et al., 2016). Observamos que os
5 índices de diversidade genética encontrados nas populações de *E. cyclothorax* estão
6 dentro das variáveis observadas neste grupo de aranhas, contudo, apresentaram
7 valores consideravelmente mais baixos (Tab. 3).

8 A baixa diversidade genética identificada (H_E) somada aos altos e
9 significativos valores de coeficiente de endogamia (F_{IS}) observados na metade das
10 populações avaliadas, sugerem uma vulnerabilidade de *E. cyclothorax*. Segundo
11 Frankhan, Ballou & Briscoe (2008), a endogamia geralmente está relacionada com a
12 perda da diversidade genética nas populações (reduzindo a heterozigosidade) e, com
13 isso, em tais populações geneticamente comprometidas aumenta-se o risco de
14 extinção a curto ou a longo prazo, uma vez que a diversidade genética é
15 imprescindível para que populações evoluam e se adaptem as mudanças ambientais,
16 sejam elas antrópicas ou estocásticas. A diversidade genética de *E. cyclothorax* não
17 parece estar relacionada com o tamanho das UCs, uma vez que um dos maiores
18 índices de diversidade foi observado em GUA ($H_E = 0,29$), que representa uma das
19 menores UCs avaliadas. Em contrapartida, o menor valor de H_E foi observado na maior
20 e mais conservada UC amostrada (MAT). Neste último caso, é possível que os
21 resultados de diversidade e endogamia sejam explicados pelo isolamento natural
22 deste parque, que é estremado pela Serra do Mar e encontra-se a uma altitude média
23 muito inferior, pela própria característica biológica da espécie, pelo tamanho
24 populacional ou por acidentes ambientais aleatórios que possam ter ocorridos.

25 A população de VIL exibiu um número muito elevado de alelos
26 privados ($A_P = 82$), mesmo apresentando um dos menores números de *loci*
27 polimórficos ($N_{LP} = 265$). Os números de alelos privados observados nas outras
28 populações são bem inferiores indicando maior isolamento desta população em
29 relação às outras. Somado a isso, todos os indivíduos de VIL apresentam o *cluster* 3
30 (rosa) na sua composição genética que, evidentemente, se distingue da composição
31 genética de todas as outras populações. VIL é a única população localizada nos
32 Campos Gerais do Paraná, que apresenta uma fitofisionomia particular combinando
33 campos limpos e campos cerrados naturais com isoladas Florestas Ombrófilas Mistas
34 (Moro & Carmo, 2007; Carmo, Moro & Nogueira, 2007; Ritter, Ribeiro & Moro, 2010).
35 Além disso, os Campos Gerais localizam-se ao leste do segundo planalto paranaense,
36 a uma altitude média muito elevada, com topos atingindo 1.290 metros de altitude
37 (Melo et al., 2007), isolados naturalmente por uma barreira geomorfológica conhecida
38 como Escarpa Devoniana (Melo, Moro & Guimarães, 2007). Possivelmente esses
39 fatores foram determinantes na variação genética encontrada em VIL. Apesar deste
40 isolamento, essa população detém a maior diversidade genética, sem indícios de
41 acasalamento entre aparentados.

42 Os resultados também apontam uma alta e significativa estruturação
43 genética para *E. cyclothorax*, padrão este suportado pelas análises Structure, AMOVA
44 e Rede de *Network*, levantando a ideia da possível existência de duas unidades
45 taxonômicas geneticamente distintas nas áreas de estudo (Fig. 2, 4). A forte
46 estruturação genética encontrada pode estar relacionada com diferentes fatores,
47 dentre eles destacamos o relevo e as diferentes fitofisionomias existentes no Paraná.
48 Possivelmente, as sub-regiões biogeográficas sejam importantes para a delimitação
49 da variabilidade genética de *E. cyclothorax*, uma vez que populações geneticamente
50 semelhantes coincidem com as formações florestais e com as variações altitudinais

1 do estado. Embora as formações florestais pertençam todas ao bioma Mata Atlântica,
2 as populações de *E. cyclothorax* se adaptaram a diferentes condições ambientais.

3 Ao longo do gradiente geomorfológico do Paraná, observamos GOD,
4 REB e RIO no terceiro planalto, caracterizadas por altitudes menores (abaixo de 500
5 metros) e por florestas adaptadas ao clima mais quente (Floresta Estacional
6 Semidecidual) (Wrege et al., 2017). Já GUA e VIL estão presentes no segundo
7 planalto, isoladas naturalmente pela Serra Geral e a Escarpa Devoniana (Melo, Moro
8 & Guimarães, 2007), caracterizadas por florestas mais sensíveis as variações
9 climáticas, adaptadas a temperaturas mais baixas e maiores altitudes (Floresta
10 Ombrófila Mista) (Wrege et al., 2017). Por sua vez, MAT localiza-se na planície
11 litorânea, a uma altitude muito inferior, com florestas úmidas e quentes (Floresta
12 Ombrófila Densa) (Wrege et al., 2017). Portanto, a fitofisiologia e o relevo moldam as
13 paisagens naturais do Paraná e parecem ser determinantes na variabilidade genética
14 atual de *E. cyclothorax*, tais fatores tem conexão com o isolamento geográfico dessas
15 aranhas.

16 Alterações dos espaços físicos dessas diferentes formações florestais
17 ocorrerão nos próximos 67 anos, como consequência das mudanças climáticas
18 globais (Wrege et al., 2017). De acordo com Wrege et al. (2017) as Florestas
19 Ombrófilas Mistas são mais sensíveis a essas mudanças, com o aumento da
20 temperatura do planeta haverá retração de 96% dessas florestas, enquanto as
21 Florestas Estacionais Semidecíduais se expandirão em 72%. Com isso, destacamos
22 GUA como a população mais vulnerável aqui avaliada, além da baixa diversidade
23 genética associada ao elevado índice de endogamia, trata-se de uma população
24 caracterizada por Florestas Ombrófilas Mistas, ameaçadas pelo atual cenário
25 climático.

26 Além disso, destacamos o deslocamento limitado da espécie
27 (Willemart e Kaneto, 2004) e o baixo fluxo gênico entre os dois grandes grupos
28 genéticos como fatores determinantes na estruturação genética de *E. cyclothorax*.
29 Estes fatores se tornam cada vez mais limitantes à medida que paisagens antrópicas
30 vão tomando o lugar das florestas, com tendência de que os fragmentos florestais
31 permaneçam isolados (Tabarelli et al., 2012), ameaçando a conservação da espécie.
32 O comportamento preferencialmente arborícola de fêmeas e juvenis, enquanto
33 machos adultos encontram-se em movimentação no solo (Willemart & Kaneto, 2004),
34 sugere que a espécie tenha dispersão limitada, com fluxo gênico ocorrendo
35 preferencialmente pela dispersão dos machos na época da cópula. Como não há
36 registro de dispersão aérea para *E. cyclothorax* é possível supor que a forte estrutura
37 genética encontrada também seja resultado do isolamento das populações
38 fragmentadas, sendo o desmatamento um aspecto secundário, e não principal, que
39 explique essa estruturação genética. Vale ressaltar que dentro de cada grupo genético
40 existem populações a longas distâncias que apresentaram, de alguma forma, troca
41 gênica. Talvez, pequenos fragmentos possam estar envolvidos no fluxo gênico, assim
42 como levantado por Macrini Peres & Solferini (2015), que relatam a possibilidade
43 desses fragmentos servirem como trampolins entre os pontos de coleta.

44 Levando ainda em consideração a biologia da espécie, outra
45 estimativa importante a ser destacada é o F_{IS} , significativo nas populações GOD, GUA
46 e MAT. Como mencionado anteriormente, as fêmeas de *E. cyclothorax* habitualmente
47 permanecem mais em repouso nas árvores e, somado a isso, sabe-se que as
48 espécies de Ctenidae depositam cerca de 800 a 1.200 ovos (Bücherl, 1950), o que
49 poderia explicar os índices significativos de endocruzamento. Apesar disso, é
50 importante ressaltar que apesar de todas as populações apresentarem essas mesmas

1 características biológicas, o padrão de F_{IS} observado não foi igual para todas elas.

2 Nossos resultados também preveem o isolamento por distância como
3 fator importante na diferenciação genética observada em *E. cyclothorax*, por meio do
4 teste de Mantel que encontrou correlação positiva entre a diferenciação genética e a
5 distância geográfica das populações aqui analisadas ($r^2 = 0,32$). Desta forma,
6 provavelmente 32% da diferenciação genética entre as populações de *E. cyclothorax*
7 está correlacionada à distância geográfica. O resultado do programa Barrier também
8 evidenciou uma associação significativa entre a composição genética das populações
9 e a geografia, indicando presença de uma barreira genética entre as populações do
10 Norte/Noroeste/Oeste e as populações do Leste, evidenciando, mais uma vez, uma
11 forte diferenciação genética entre as populações destas regiões.

12 Evidenciamos maior fluxo gênico entre as populações do Norte,
13 Noroeste e do Oeste (GOD, REB e RIO) e entre as populações do Leste (GUA, VIL e
14 MAT), havendo troca gênica entre fragmentos de até 478 quilômetros de distância,
15 como RIO e GOD. Os valores de F_{ST} par a par mais elevados foram entre as
16 populações VIL e RIO/REB (0,92), que apresentam distâncias de até 401 quilômetros
17 e estão separadas pela barreira genética detectada no Barrier. Já as populações GOD
18 e RIO apresentam a maior distância geográfica entre fragmentos (478 km), mesmo
19 assim observamos um $F_{ST} = 0,12$, valor este que, apesar de significativo, foi bem
20 inferior. Isso indica mais uma vez que, possivelmente, algum outro fator, além do baixo
21 fluxo gênico entre os dois grandes grupos, esteja envolvido na forte estruturação
22 evidenciada para *E. cyclothorax*. Como já mencionado, as formações florestas e o
23 relevo parecem estar intimamente relacionados com essa diferenciação genética,
24 análises filogeográficas devem ser aplicadas em estudos futuros para melhor
25 compreensão dos fatores históricos envolvidos na história evolutiva desta espécie.

26 Pela análise de estruturação *bayesiana* ficou evidente que o *cluster*
27 predominante nos indivíduos das populações do Norte, Noroeste e do Oeste do
28 estado é diferente do *cluster* predominante nas populações mais a Leste do estado,
29 com pouca ou nenhuma mistura entre eles (Fig. 2). O valor de F_{ST} global foi elevado
30 ($F_{ST} = 0,70$), assim como a maioria dos valores de F_{ST} entre populações mais
31 distantes, tais resultados possivelmente são reflexos do baixo fluxo gênico entre elas,
32 identificado pela análise no EDENetworks (Fig. 4). Avaliar a estruturação genética tem
33 sido o principal objetivo nos estudos populacionais de aranhas que, assim como este
34 trabalho, tem identificado diferenciação genética significativa nas populações
35 analisadas, a partir de diferentes marcadores genéticos nucleares. Salgado-Roa et al.
36 (2021), por exemplo, avaliaram a influência da Cordilheira Oriental dos Andes
37 colombianos na diversificação de *Ancylometes bogotensis* (Keyserling, 1877)
38 (Ctenidae). Os autores citados amplificaram dois *loci*, dentre eles a região nuclear
39 ITS2, e detectaram forte estruturação genética entre as populações ($F_{ST} = 0,68$),
40 revelando duas linhagens genéticas principais separadas pela cordilheira. Já Macrini,
41 Peres & Solferini (2015) avaliaram a genética populacional de *Aglaoctenus lagotis*
42 (Lycosidae) a partir do gene mitocondrial COI e oito *loci* SSR, que revelaram um F_{ST}
43 global igual a 0,337 e presença de duas linhagens genéticas distintas nos cinco
44 fragmentos de Mata Atlântica analisados, que devem ser consideradas unidades
45 individuais em estudos futuros.

46 Outros estudos com espécies de Lycosidae também tem
47 demonstrado valores de F_{ST} elevados, como em *Pardosa pseudoannulata* (0,3670) e
48 *Lycosa ishikariana* (0,7938) (Jiying et al., 2007; Tanikawa et al., 2018,
49 respectivamente). O único trabalho populacional a nível genômico também encontrou
50 uma forte estruturação genética para *Nesticus barri* (Nesticidae), com F_{ST} par a par

1 variando de 0,33 a 0,52 (Balog et al., 2020). Portanto, comparado à literatura, o
2 presente trabalho evidenciou uns dos F_{ST} mais elevados, demonstrando a
3 sensibilidade de *E. cyclothorax* ao isolamento populacional.

4 Os resultados aqui apresentados são importantes para a
5 compreensão da variabilidade genética de *E. cyclothorax* e revelam a vulnerabilidade
6 desta espécie, por meio dos índices baixos de diversidade genética, significativos de
7 endocruzamento e, especialmente, pelo alto grau de estruturação genética entre as
8 populações. Fatores como fitofisionomia, relevo, distâncias geográficas, biologia da
9 espécie e fragmentação florestal estão relacionadas com a elevada diferenciação
10 genética entre os dois grupos genéticos principais, separando as populações do
11 norte/noroeste/oeste das populações ao leste do Paraná, compondo duas unidades
12 taxonômicas distintas no estado. Trabalhos futuros devem considerar a possibilidade
13 de que tais unidades taxonômicas possam representar espécies distintas e, ademais,
14 considerando toda a área de ocorrência de *E. cyclothorax*, uma revisão deve ser
15 realizada diante da possibilidade de novos grupos genéticos identificados.

16 AGRADECIMENTOS

17 Os autores agradecem às UCs pela liberação das coletas; ao ICMBio;
18 à Fundação Araucária e ao Grupo Boticário, à Coordenação de Aperfeiçoamento de
19 Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de
20 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.
21 Agradecemos também a Robson Rockembacher pelo auxílio durante as coletas.

22 5.5 BIBLIOGRAFIA

23 Almeida, F. S. de, Fungaro, M. H. P., & Sodré, L. M. K. (2001). RAPD and isoenzyme
24 analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes:
25 Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology*, 253, 113-120.

26 Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence
27 Data. Available online at:
28 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

29 Balogh, A., Ngo, L., Zigler, K. S., & Dixon, G. (2020). Population genomics in two cave-
30 obligate invertebrates confirms extremely limited dispersal between caves.
31 *Scientific Reports*, 10, 17554.

32 Boas Junior, F. E. V., Ferreira, A. S., & Souza, M. M. de. (2020). The effect of
33 fragmentation on spider richness (Arachnida: Araneae) in montane
34 semideciduous seasonal forest. *Revista Agrogeoambiental*, 12, 45-57.

35 Bucherl, M. (1950). Revisão das espécies do gênero *Enoploctenus* Simon, 1897. Men.
36 Inst. Butantan, 23, 1-44.

37 Carmo, M. R. B. do, Moro, R. S., & Nogueira, M. K. F. de S. (2007). A vegetação
38 florestal nos Campos Gerais. In: Melo, M. S.; Moro, R. S.; & Guimarães, G. B.
39 Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG.

- 1 Cap. 9, p.99-104.
- 2 Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011).
3 Stacks: building and genotyping loci *de novo* from short-read sequences. *G3: Genes| genomes| genetics*, 1, 171-182.
4
- 5 Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013).
6 Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular ecology*, 22, 3124-
7 3140.
- 8 Chang, J., Song, D., & Zhou, K. (2007). Incongruous nuclear and mitochondrial
9 phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa*
10 *astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and*
11 *Evolution*, 42, 104–121.
- 12 Dias, S. C., Carvalho, L. S., Bonaldo, A. B., & Brescovit, A. D. (2010). Refining the
13 establishment of guilds in Neotropical spiders (Arachnida: Araneae). *Journal of*
14 *Natural History*, 44, 219–239.
- 15 Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., &
16 Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS)
17 approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6, e19379.
- 18 Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs
19 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular*
20 *Ecology Resources*, 10, 564-567.
- 21 Frankhan, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2008). *Fundamentos de Genética da*
22 *Conservação*. Tradução: Farias, M. R. F. I. P. Ribeirão Preto: Sociedade
23 Brasileira de Genética.
- 24 Fundação SOS Mata Atlântica (2021). Relatório Anual 2021. São Paulo: Fundação
25 SOS Mata Atlântica.
- 26 Fundação SOS Mata Atlântica; INPE (2021). Atlas dos Remanescentes Florestais da
27 Mata Atlântica: período 2019-2020 relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS
28 Mata Atlântica.
- 29 Fundação SOS Mata Atlântica; INPE (2022). Atlas dos Remanescentes Florestais da
30 Mata Atlântica: período 2020-2021 relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS
31 Mata Atlântica.
- 32 González-Trujillo, R., Correa-Ramírez, M. M., Ruiz-Sanchez, E., Salinas, E. M.,
33 Jiménez, M. L., & García-De León, F. J. (2016). Pleistocene refugia and their
34 effects on the phylogeography and genetic structure of the wolf spider *Pardosa*
35 *sierra* (Araneae: Lycosidae) on the Baja California Peninsula. *Journal of*
36 *Arachnology*, 44, 367-379.
- 37 Hataway, R. A., Reed, D. H., & Noonan, B. P. (2011). Development of 10 microsatellite
38 loci in the wolf spider *Arctosa sancterosae* (Araneae: Lycosidae). *Conservation*

- 1 *Genetics Resources*, 3, 271–273.
- 2 Janes, J. K., Miller, J. M., Dupuis, J. R., Malenfant, R. M., Gorrell, J. C., Cullingham,
3 C. I., & Andrew, R. L. (2017). The $K = 2$ conundrum. *Molecular Ecology*, 26, 3594-
4 3602.
- 5 Jiying, S., Xiuqin, F., Guangxu, P., Zhigang, Z., & Hengmei, Y. (2007). Influence of
6 long-period pesticide force on genetic polymorphism of wolf spider *Pardosa*
7 *pseudoannulata* (Lycosidae: Araneae). *Progress in Natural Science*, 17, 1161-
8 1165.
- 9 Kivelä, M., Arnaud-Haond, S., & Saramaki, J. (2014). EDENetworks: a userfriendly
10 software to build and analyses networks in biogeography, ecology and population
11 genetics. *Molecular Ecology Resources*, 15, 117–122.
- 12 Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015).
13 Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population
14 structure inferences across K . *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179–1191.
- 15 Macrini, C. M. T., Peres, E. A., & Solferini, V. N. (2015). Cryptic diversity of *Aglaoctenus*
16 *lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest: evidence from
17 microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Applied Biology*
18 *and Biotechnology*, 3, 009-014.
- 19 Manni, F., & Guérard, E. (2004). Barrier v. 2.2. Manual of the user. *Museum of Mankind*
20 (*Musée de l'Homme*), Paris.
- 21 MapBiomias (2022). DESTAQUES DO MAPEAMENTO ANUAL DA COBERTURA E
22 USO DA TERRA NO BRASIL DE 1985 A 2021: MATA ATLÂNTICA. São Paulo:
23 MapBiomias.
- 24 MapBiomias Alerta (2022). RAD 2021: RELATÓRIO ANUAL DO DESMATAMENTO
25 NO BRASIL. São Paulo: MapBiomias.
- 26 Melo, M. S., Moro, R. S., & Guimarães, G. B. (2007). Os Campos Gerais do Paraná.
27 *In*: Melo, M. S., Moro, R. S., & Guimarães, G. B. Patrimônio natural dos Campos
28 Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG. Cap. 1, p. 17-21.
- 29 Melo, M. S., Guimarães, G. B., Ramos, A. F., & Prieto, C. C. (2007). Relevo e
30 hidrografia dos Campos Gerais. *In*: Melo, M. S., Moro, R. S., & Guimarães, G. B.
31 Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG.
32 Cap. 4, p.49-58.
- 33 Moro, R. S., & Carmo, M. R. B. do. (2007). A vegetação campestre nos Campos
34 Gerais. *In*: Melo, M. S., Moro, R. S., & Guimarães, G. B. Patrimônio natural dos
35 Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG. Cap. 8, p.93-98.
- 36 Pereira, A. B. (2009). Mata Atlântica: uma abordagem geográfica. *Nucleus*, 6, 1-27.
- 37 Pinto, L. F. G., & Voivodiv, M. (2021). Reverse the tipping point of the Atlantic Forest

- 1 for mitigation. *Nature*, 11, 364-365.
- 2 Pinto, L. P., & Hirota, M. M. (2022). 30 anos da Conservação do *Hotspot* de
3 Biodiversidade Mata Atlântica: desafios, avanços e um olhar para o futuro. São
4 Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica.
- 5 Platnick, N. I. (2020). *Spiders of the world: a natural history*. Princeton: Princeton
6 University Press.
- 7 Polotow, D., & Brescovit, A. D. (2018). *Kiekie*, a new Neotropical spider genus of
8 Ctenidae (Cteninae, Araneae). *Zootaxa*, 4531, 353-373.
- 9 Postiglioni, R., Bidegaray-Batista, L., Simó, M., & Arnedo, M. A. (2019). Move to stay:
10 genetic structure and demographic history of a wolf spider inhabiting coastal sand
11 dunes of southern South America. *Systematics and Biodiversity*, 17, 635–649.
- 12 Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure
13 Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959.
- 14 Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct
15 population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators
16 alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, 16, 608–627.
- 17 Rego, F. N. A. A., Venticinque, E. M., & Brescovit, A. D. (2005). Densidades de
18 aranhas errantes (Ctenidae e Sparassidae, Araneae) em uma floresta
19 fragmentada. *Biota Neotropica*, 5(n1a), 1-8.
- 20 Rego, F. N. A. A., Venticinque, E. M., & Brescovit, A. D. (2007). Effects of forest
21 fragmentation on four *Ctenus* spider populations (Araneae: Ctenidae) in central
22 Amazonia, Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 42, 137–144.
- 23 Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009).
24 The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest
25 distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142, 1141-
26 1153.
- 27 Ribeiro, M. C., Martensen, A. C., Metzger, J. P., Tabarelli, M., Scarano, F., & Fortin,
28 M. J. (2011). The Brazilian Atlantic Forest: A shrinking biodiversity hotspot. *In*:
29 Zachos, F. E., & Habel, J. C. (ed.). *Biodiversity Hotspots*. Berlin: Springer-Verlag.
30 p. 405-434.
- 31 Ritter, L. M. O., Ribeiro, M. C., & Moro, R. S. (2010). Composição florística e
32 fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR,
33 Brasil-limite austral do bioma. *Biota Neotropica*, 10, 379-414.
- 34 Rousset, F., & Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency.
35 *Genetics*, 140, 1413-1419.
- 36 Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP
37 software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.

- 1 Saiter, F. Z., Eisenlohr, P. V., Franca, G. S., Stehmann, J. R., Thomas, W. W., &
2 Oliveira-Filho, A. T. (2015). Floristic units and their predictors unveiled in part of
3 the Atlantic Forest hotspot: implications for conservation planning. *Anais da*
4 *Academia Brasileira de Ciências*, 87, 2031-2046.
- 5 Salgado-Roa, F. C., Gamez, A., Sanchez-Herrera, M., Pardo-Díaz, C., & Salazar, C.
6 (2021). Divergence promoted by the northern Andes in the giant fishing spider
7 *Ancylometes bogotensis* (Araneae: Ctenidae). *Biological Journal of the Linnean*
8 *Society*, 132, 495-508.
- 9 Stefani, V., & Del-Claro, K. (2015). The effects of forest fragmentation on the
10 population ecology and natural history of a funnel-web spider. *Journal of Natural*
11 *History*, 49, 211–231.
- 12 Tabarelli, M., Aguiar, A. V., Ribeiro, M. C., Metzger, J. P. (2012). A conversão da
13 floresta atlântica em paisagens antrópicas: lições para a conservação da
14 diversidade biológica das florestas tropicais. *Interciencia*, 37, 88-92.
- 15 Tanikawa, A., Shinkai, A., Tatsuta, H., & Miyashita, T. (2018). Highly diversified
16 population structure of the spider *Lycosa ishikariana* inhabiting sandy beach
17 habitats. *Conservation genetics*, 19, 255-263.
- 18 Trajano, E. (2019). Biodiversity in South America. In: White, W. B., Culver, D. C., &
19 Pipan T. *Encyclopedia of Caves* (3 ed.). Cambridge: Academic Press.
- 20 Vankhede, G., Hadole, P., & Chakravarthy, A. K. (2016). Spiders: Diversity,
21 Distribution, and Conservation. In: Chakravarthy, A. K., & Sridhara, S. *Arthropod*
22 *Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics*. Bengaluru: Springer.
- 23 Willemart, R. H., & Kaneto, G. E. (2004). On the natural history of the Neotropical
24 spider *Enoploctenus cyclothorax* (Araneae, Ctenidae). *Bulletin-British*
25 *Arachnological Society*, 13, 53-59.
- 26 Willemart, R. H., & Lacava M. (2017). Foraging Strategies of Cursorial and Ambush
27 Spiders. In: Viera, C., & Gonzaga, M. O. *Behaviour and Ecology of Spiders.*
28 *Contributions from the Neotropical Region*. Switzerland: Springer.
- 29 Wrege, M. S., Garrastazu, M. C., Soares, M. T. S., Fritzsos, E., de Sousa, V. A., &
30 de Aguiar, A. V. (2017). Principais fitofisionomias existentes no estado do Paraná
31 e os novos cenários definidos pelas mudanças climáticas globais. *Ambiência,*
32 *Guarapuava*, 13, 600-615.
- 33 BIBLIOGRAFIA ON-LINE
- 34 *Google Earth website*. Disponível em: <http://earth.google.com/>. Acesso em: 24 out.
35 2022.
- 36 *IAT*. Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/>. Acesso em: 24 out. 2022.

- 1 *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade | Parna de Saint-Hilaire-*
2 *Lange.* Disponível em: [https://www.gov.br/icmbio/pt-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/parna-de-saint-hilaire-lange)
3 [br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/parna-de-saint-hilaire-lange)
4 [atlantica/lista-de-ucs/parna-de-saint-hilaire-lange](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/parna-de-saint-hilaire-lange). Acesso em: 24 out. 2022.
- 5 *Parque Nacional de Saint-Hilaire/Lange | Serra da Prata.* Disponível em:
6 <https://parnasainthilairelange.wordpress.com/>. Acesso em: 24 out. 2022.
- 7 *Specieslink.* Disponível em: <https://specieslink.net/search/>. Acesso em: 24 out. 2022.

ANEXOS

Tabela S1 Relação dos espécimes utilizados nas análises genômicas populacionais, com seus respectivos números de tombo, localidade, sexo e estágio.

COD espécime	Espécie	Sexo	Estágio	Número tombo do voucher	Localidade
248	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	283127	GOD
252	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	215872	GOD
257	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283133	GOD
258	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	215871	GOD
261	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283038	GOD
354	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283134	GOD
1609	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	247493	GOD
1610	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	247482	GOD
1611	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283120	GOD
1612	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283121	GOD
1613	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283122	GOD
1614	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283123	GOD
1615	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283124	GOD
1616	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247483	GOD
1617	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247494	GOD
1618	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283125	GOD
1619	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247484	GOD
1623	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283126	GOD
1625	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	247488	GOD
1627	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283037	GOD
1666	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282955	GUA
1669	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282938	GUA
1670	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282973	GUA
1671	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282960	GUA
1678	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282969	GUA
1679	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282942	GUA
1681	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282958	GUA
1682	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282948	GUA
1684	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282959	GUA
1685	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282972	GUA
1686	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282966	GUA
1687	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282961	GUA
1698	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282974	GUA
1699	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282956	GUA
1700	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282968	GUA
1701	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282957	GUA
1702	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282941	GUA
1704	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282944	GUA
1707	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282954	GUA
1708	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282943	GUA

759	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242360	VIL
762	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242363	VIL
763	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242364	VIL
798	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242517	VIL
799	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242518	VIL
801	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242532	VIL
803	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242534	VIL
812	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283135	VIL
813	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242540	VIL
814	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242541	VIL
828	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242544	VIL
829	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283039	VIL
837	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242547	VIL
864	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242561	VIL
865	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242562	VIL
886	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242416	VIL
903	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242374	VIL
905	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242520	VIL
1048	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282996	MAT
1052	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282993	MAT
1053	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282982	MAT
1088	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	323194	MAT
1091	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282985	MAT
1093	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283056	MAT
1094	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283057	MAT
1095	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283040	MAT
1096	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283011	MAT
1097	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282984	MAT
1098	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283058	MAT
1099	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282997	MAT
1129	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283041	MAT
1130	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283042	MAT
1131	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283059	MAT
1166	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242133	MAT
1428	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283065	RIO
1430	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	323195	RIO
1437	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283068	RIO
1463	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283069	RIO
1467	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283087	RIO
1468	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283070	RIO
1469	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283071	RIO
1471	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283045	RIO
1488	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283050	RIO
1489	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283051	RIO
1491	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283080	RIO

1492	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283052	RIO
1493	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283093	RIO
1494	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283081	RIO
1496	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283094	RIO
1497	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283053	RIO
1498	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283083	RIO
1499	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283095	RIO
1504	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247495	RIO
1507	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283096	REB
1515	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283104	REB
1543	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283106	REB
1552	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282986	REB
1553	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	247504	REB
1555	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283108	REB
1557	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283032	REB
1558	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283110	REB
1559	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283007	REB
1562	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283113	REB
1563	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283054	REB
1565	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283034	REB
1566	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283114	REB
1568	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283116	REB
1569	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247506	REB
1575	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283117	REB
1579	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283118	REB
1580	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283119	REB
1628	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247490	REB
1629	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247491	REB

COD: código de identificação; F: fêmea; M: macho; J: jovem; GOD: Parque Estadual Mata dos Godoy (Londrina); GUA: Parque Estadual do Guartelá (Tibagi); VIL: Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa); MAT: Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (Matinhos); RIO: Parque Estadual Rio Guarani (Três Barras do Paraná); REB: Reserva Biológica das Perobas (Tuneiras do Oeste).

Tabela S2 Indivíduos retirados das análises populacionais devido a quantidade extremamente baixa de leituras brutas retidas em relação as outras amostras.

ID indivíduo	População	Leituras retidas	Média de leituras brutas
838	Pop3	1.536	2.046.475,108
1029	Pop4	1.876	2.046.475,108
1030	Pop4	30	2.046.475,108
1032	Pop4	17	2.046.475,108
1047	Pop4	5.742	2.046.475,108
1486	Pop5	3.932	2.046.475,108

ID: identificação; Pop: população; Pop3: Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa); Pop4: Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (Matinhos); Pop5: Parque Estadual Rio Guarani (Três Barras do Paraná).

Tabela S3 Polimorfismos identificados no conjunto de dados de *E. cyclothorax*.

REF	ALT	N	Mutação
A	C	156	Transversão
A	G	416	Transição
A	T	138	Transversão
C	A	184	Transversão
C	G	122	Transversão
C	T	681*	Transição
G	A	628*	Transição
G	C	121	Transversão
G	T	185	Transversão
T	A	142	Transversão
T	C	436	Transição
T	G	110	Transversão

REF: alelo referência; ALT: alelo alternativo; N: número de sítios encontrados do total de 3.319 sítios variantes. Mutações mais frequentes (*).

Tabela S4 Resultados dos testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e do *U-test*, usando 10.000 iterações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC).

Pop	Teste de Hardy-Weinberg quando H1 = déficit de heterozigotos - valores P	SE	Teste de Hardy-Weinberg quando H1 = excesso de heterozigotos - valores P	SE
GOD	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000
RIO	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000
REB	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000
GUA	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000
VIL	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000
MAT	0.0000*	0.0000	1.0000	0.0000

Pop: código das populações. * $p < 0.05$ (significativo).

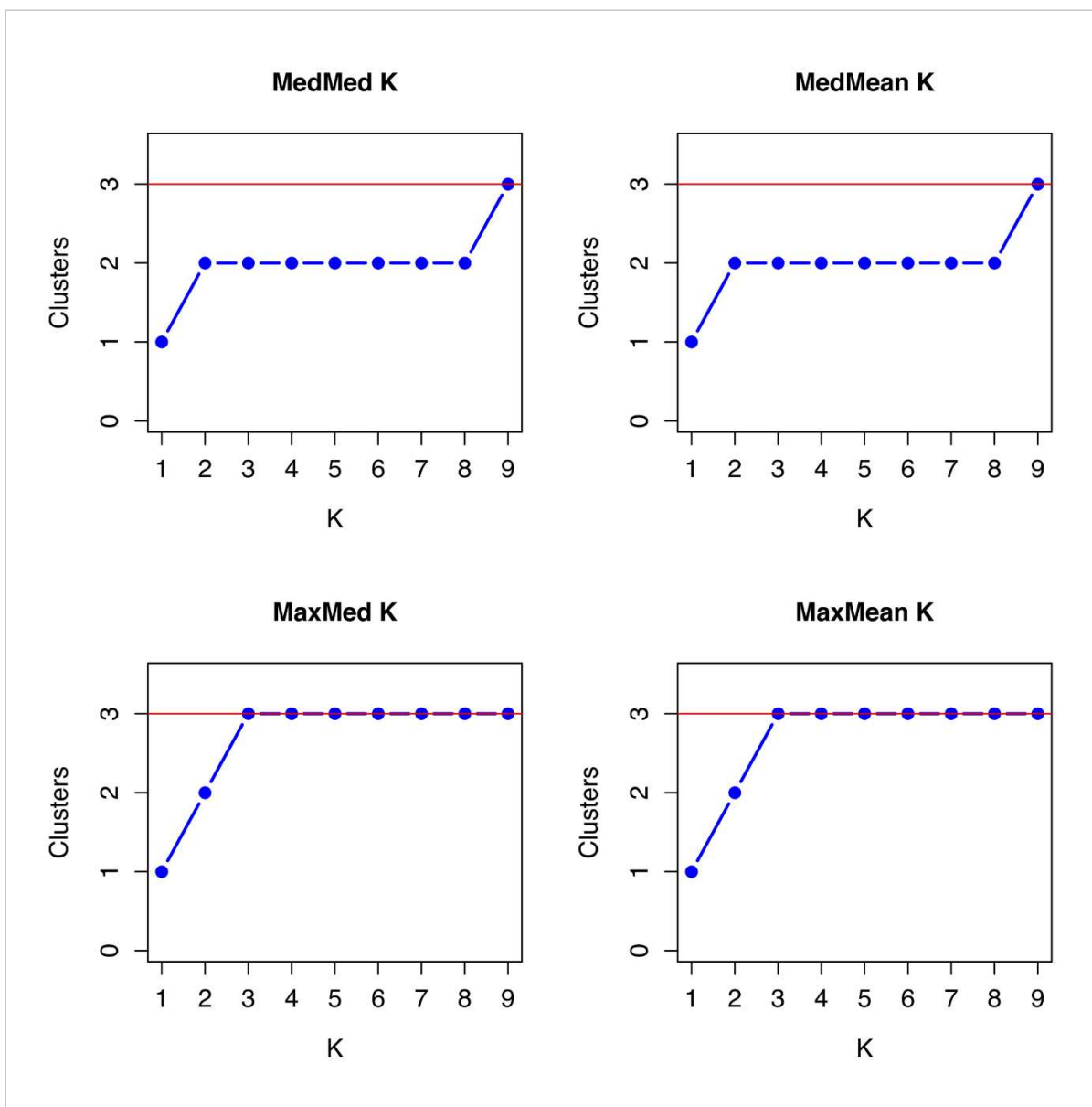


Figura S1 Número de grupos genéticos (*clusters*) mais provável, evidenciado pelo método de Puechmaille (2016) por meio da ferramenta online Structure Selector, que revelou um número mais provável de $K = 3$ para os *loci* avaliados.

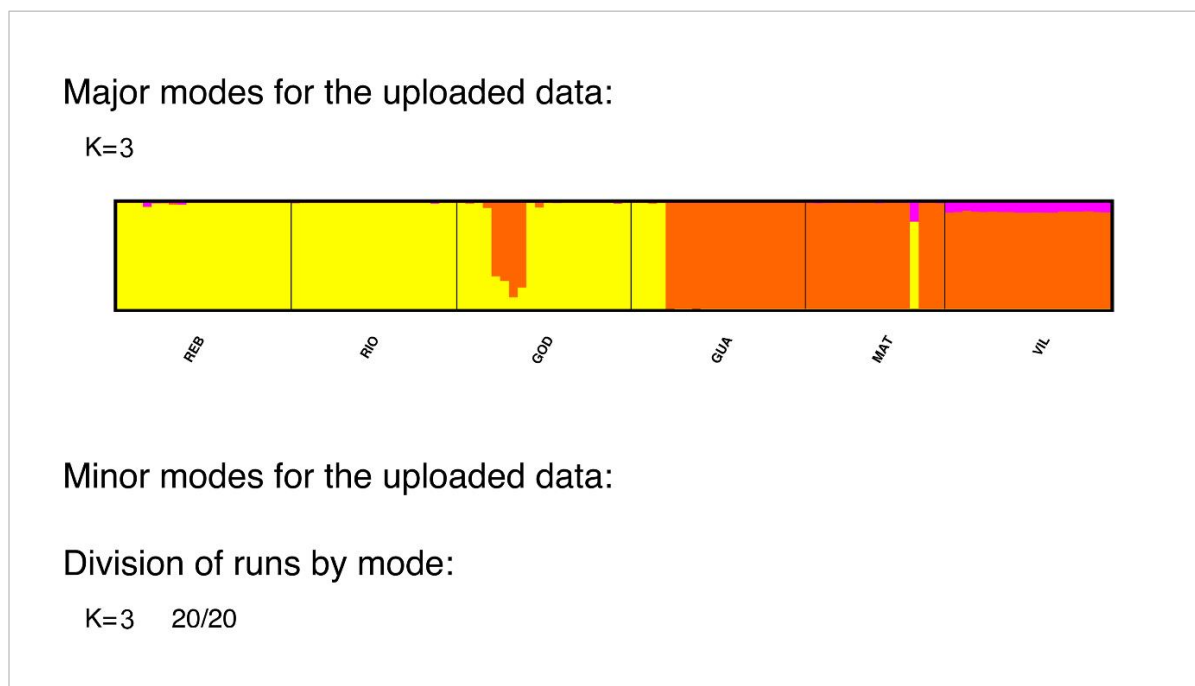
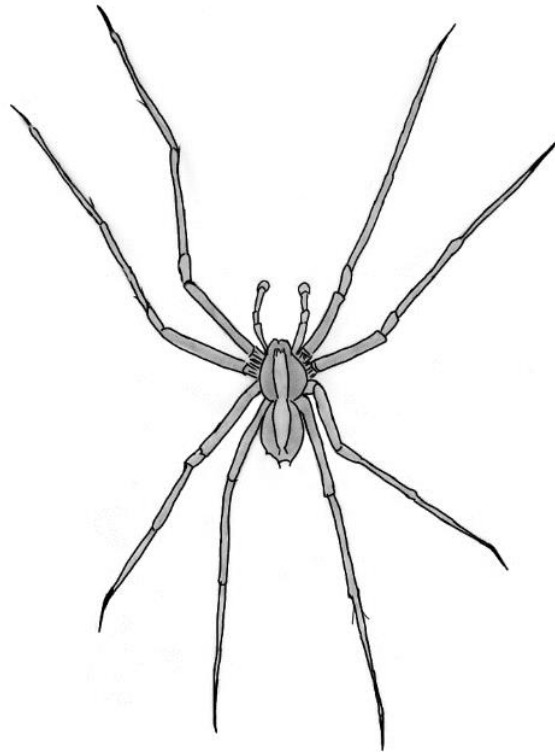


Figura S2 Gráfico resumido das simulações realizadas no programa Structure. Para um $K = 3$, das 20 simulações que foram feitas obteve-se 20 simulações convergentes, havendo 100% de concordância nos agrupamentos e uma estabilidade na análise.



6. CAPÍTULO 2

Diversidade críptica em *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae: Ctenidae) identificada por DNA *barcoding*

Será enviado para publicação na revista Conservation Genetics

1 **Diversidade críptica em *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (Araneae:**
2 **Ctenidae) identificada por DNA *barcoding***

3 Mariana Costa Terra¹, Antonio Domingos Brescovit², Ana Lúcia Dias¹, Matheus Pires
4 Rincão³, Renata da Rosa¹

5 ¹ Laboratório de Citogenética e Entomologia Molecular, Departamento de Biologia
6 Geral, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina
7 (UEL), Londrina, PR, Brasil

8 ² Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

9 ³ Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciência Biológicas - Campus Luiz
10 Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, PR,
11 Brasil

1

RESUMO

2 Os períodos de oscilações climáticas quaternárias tiveram grande influência sobre a
3 distribuição da Mata Atlântica brasileira, tal como as variações no nível do mar durante
4 o último máximo glacial. A porção sul das florestas atlânticas sofreram ainda mais com
5 essa dinâmica demográfica, e o impacto desses eventos resultaram em forte
6 estruturação genética e filogeográfica em *Enoploctenus cyclothorax* no estado do
7 Paraná, Brasil. O presente trabalho buscou avaliar se *E. cyclothorax* esconde
8 profundas estruturas genéticas, e testar a hipótese de unidades taxonômicas distintas
9 a partir do DNA mitocondrial Citocromo c oxidase subunidade I (COI). As análises de
10 delimitação de espécies sugerem duas linhagens genéticas distintas em *E.*
11 *cyclothorax*, baseadas principalmente em distância genética, compartilhamento de
12 haplótipos e árvore de gene. Uma quebra filogeográfica separa as linhagens em duas
13 regiões geográficas distintas, uma linhagem encontra-se exclusivamente na região
14 leste e a outra encontra-se majoritariamente nas regiões norte e oeste do estado. A
15 árvore de coalescência estima o tempo de divergência das linhagens em 1 milhão e
16 200 mil anos, período marcado por significativas retrações das florestas atlânticas
17 brasileiras. Os dados aqui apresentados elucidam o tamanho do impacto das
18 oscilações climáticas do Pleistoceno na espécie *E. cyclothorax*, e tais resultados
19 provavelmente podem ser extrapolados para a araneofauna presente na porção sul
20 da Mata Atlântica.

21 **Palavras-chave:** aranhas, COI, delimitação de espécie, estruturação genética,
22 filogeografia, Quaternário.

1 6.1 INTRODUÇÃO

2 A espécie sul-americana *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) é
3 caracterizada por seus hábitos preferencialmente arborícolas e cavernícolas, por sua
4 dispersão limitada e por hábitos noturnos de caça e reprodução. Considerando seu
5 impacto predatório enquanto aranha caçadora, exerce um importante papel ecológico
6 no controle de presas, especialmente artrópodes como baratas, moscas e grilos
7 (Willemart e Kaneto 2004). Apontada como espécie-tipo do gênero (Polotow e
8 Brescovit 2014), *E. cyclothorax* ocorre associada a regiões de Mata Atlântica no Brasil,
9 com registros de ocorrência nas regiões sul e sudeste do país (Specieslink 2023).

10 Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica (2021), o bioma mais
11 ameaçado do Brasil é a Mata Atlântica, com baixa área original de floresta preservada.
12 Os índices de desmatamento só aumentam nos últimos anos e o impacto da
13 fragmentação florestal em *E. cyclothorax* pode ser observado por meio da alta
14 estruturação genética recentemente detectada para a espécie (Fundação SOS Mata
15 Atlântica e INPE 2021, 2022; Terra et al., em fase de pré-publicação). A avaliação da
16 estrutura genética em populações naturais de aranhas tem demonstrado resultados
17 semelhantes, uma diferenciação genética significativa resultante do isolamento
18 dessas populações (Macrini, Peres e Solferini 2015; González-Trujillo et al. 2016;
19 Tanikawa et al. 2018; Postiglioni et al. 2019; Salgado-Roa et al. 2021).

20 Essa alta divergência genética encontradas em alguns grupos pode
21 acabar escondendo linhagens genéticas distintas. Terra et al. (em fase de pré-
22 publicação) conclui dizendo que talvez os grupos genéticos encontrados em *E.*
23 *cyclothorax* possam representar espécies distintas, apesar da similaridade
24 morfológica dos espécimes avaliados. Identificações de aranhas baseadas na
25 morfologia podem ser demoradas e problemáticas, devido à dificuldade existente
26 neste processo. As razões para tal dificuldade pode ser exemplificadas pelo
27 dimorfismo sexual, pela complexidade na identificação de indivíduos juvenis, e
28 também pela falta de profissionais especializados (Barrett e Hebert 2005; Robinson et
29 al. 2009).

30 O uso do DNA *barcoding* associado às revisões morfológicas acabou
31 sendo uma eficiente solução para a complexidade na identificação das espécies de
32 aranhas. Desde que Hebert, Ratnasingham e Waard (2003) propuseram um sistema
33 de identificação da vida animal baseado no DNA *barcoding* vários trabalhos de

1 identificações taxonômicas em aranhas adotaram esta ferramenta (Barrett e Hebert
2 2005; Robinson et al. 2009; Blagojev et al. 2013; Astrin et al. 2016; Gaikwad et al.
3 2016; Wang et al. 2017; Tyagi et al. 2019; Ashfaq et al. 2019; Ashraaf et al. 2020).

4 Diante disso, no presente estudo, buscamos avaliar se existem
5 espécies crípticas em *E. cyclothorax*, verificando se a espécie esconde estruturas
6 genéticas e filogeográficas no DNA mitocondrial (mtDNA) citocromo c oxidase
7 subunidade I (COI), e assim testar a hipótese de unidades evolutivas distintas.

8 **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

9 **6.2.1 Amostragem e área de estudo**

10 Amostragem de seis populações de *E. cyclothorax* (n = 114 indivíduos)
11 foram coletadas em Unidades de Conservação (UCs) ao longo do estado do Paraná,
12 Brasil (Tab. 1). Os espécimes juvenis e adultos foram capturados manualmente
13 durante as coletas noturnas, em fragmentos florestais de Mata Atlântica brasileira, e
14 depositados na coleção aracnológica do Laboratório de Coleções Zoológicas do
15 Instituto Butantan, em São Paulo/SP, Brasil (Tab. S1).

16 As UCs avaliadas são representadas pelos Parques Estaduais Mata
17 dos Godoy (GOD), do Guartelá (GUA), de Vila Velha (VIL) e Rio Guarani (RIO), além
18 do Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange (MAT) e a Reserva Biológica das Perobas
19 (REB). Estas UCs foram selecionadas considerando tamanho de área (média de
20 1.000 hectares ou mais) e diferentes regiões do estado.

Tabela 1 Caracterização das populações de *Enoploctenus cyclothorax* amostradas em UCs no estado do Paraná, Brasil.

UCs	COD	Cidade	N	M	F	J	LAT	LONG
Parq. Est. Mata dos Godoy	GOD	Londrina	20	7	12	1	23° 26' 29,37"	51° 14' 31,86"
Parq. Est. Rio Guarani	RIO	Três Barras do Paraná	19	4	14	1	25° 26' 23,10"	53° 09' 32,80"
Res. Biol. das Perobas	REB	Tuneiras do Oeste	20	11	8	1	23° 51' 42,40"	52° 45' 07,80"
Parq. Est. do Guartelá	GUA	Tibagi	20	5	15	0	24° 36' 40,44"	50° 13' 30,78"
Parq. Est. de Vila Velha	VIL	Ponta Grossa	19	7	12	0	25° 15' 15,40"	50° 00' 11,30"
Parq. Nac. Saint-Hilaire-Lange	MAT	Matinhos	16	4	3	9	25° 48' 47,20"	48° 33' 25,10"

UCs: Unidades de Conservação; Parq.: Parque; Est.: Estadual; Nac.: Nacional; Res.: Reserva; Biol.: Biológica; COD: código de identificação da população; N: número de indivíduos amostrados; M: machos coletados; F: fêmeas coletadas; J: juvenis coletados; LAT: latitude; LONG: longitude.

1 A atividade agropecuária é bastante dominante no estado e diversas
 2 matrizes agrícolas podem ser observadas no entorno das UCs (Google Earth website
 3 2023), principalmente em GOD, GUA, VIL, RIO e REB, onde matrizes urbanas
 4 também aparecem associadas. Já em MAT, uma extensa área florestal é observada,
 5 com impacto antrópico reduzido nas suas margens (Google Earth website 2023). As
 6 UCs GOD, RIO E REB são caracterizadas pela floresta Estacional Semidecidual e
 7 estão presentes no 3º Planalto Paranaense, enquanto GUA e VIL apresentam
 8 vegetações de Ombrófila Mista e Campos Gerais, respectivamente, no 2º Planalto
 9 Paranaense. Por fim, MAT situa-se na Serra do Mar, caracterizada por uma formação
 10 florestal bastante distinta presente na Planície litorânea do Paraná, a floresta
 11 Ombrófila Densa (IAT 2023).

12 **6.2.2 Extração de DNA e amplificação do gene COI**

13 Para a extração do DNA genômico total foi utilizado o protocolo com
 14 fenol-clorofórmio proposto por Almeida, Fungaro e Sodré (2001), com modificações.
 15 Em seguida, a integridade das amostras de DNA foi conferida em gel de agarose 1,5%
 16 e a quantificação realizada em NanoDrop e Qubit, para diluição do DNA a 20 ng/ L.

17 As amplificações do gene mitocondrial COI foram realizadas a partir
 18 dos *primers* LCO1490 e HCO2148 descritos por Folmer et al. (1994). Os segmentos

1 de DNA amplificados foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare Bio-Sciences
2 Ltd) e submetidos a uma reação de sequenciamento com o kit BigDye® Terminator
3 (ThermoFisher Scientific), segundo a recomendação dos fabricantes. Por fim, os
4 produtos de PCR foram sequenciados em sequenciador automático ABI-PRISM 3500
5 XL (Applied Biosystems).

6 **6.2.3 Análise dos dados**

7 A qualidade das sequências brutas foi conferida por meio do aplicativo
8 Electropherogram Quality Analysis (Togawa e Brigido 2003) disponível em
9 <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Para verificar regiões de similaridade
10 entre sequências um Blast foi realizado no banco de dados GenBank (NCBI), a fim de
11 encontrar uma sequência referência para *E. cyclothorax*. A edição manual final e o
12 alinhamento das sequências com ClustalW foram finalizados no Bioedit v.7.0.5.3 (Hall
13 1999).

14 Os cálculos de distância genética intra e interpopulacionais foram
15 realizados no programa MEGA-X v.10.2.6 (Kumar et al. 2018), baseados no modelo
16 de evolução TrN (Tamura e Nei 1993) identificado como melhor modelo de
17 substituição nucleotídica no programa jModelTest v.2.1.10 (Guindon e Gascuel 2003;
18 Durrin et al. 2012). Estimativas básicas de estrutura genética foram realizadas no
19 programa Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier e Lischer 2010).

20 O programa DAMBE v.7.3.11 (Xia 2017) foi utilizado para investigar
21 evidência de saturação mutacional, visando a identificação de sítios não confiáveis.
22 Tais sítios foram eliminados no programa SeaView v.5.4.0 (Gouy, Guindon e Gascuel
23 2009). A relação entre os haplótipos foi estabelecida por meio do programa Network
24 v.10.2.0.0 (Bandelt, Forster, Röhl 1999, 1999-2021). A estimativa de tempo de
25 divergência foi realizada no programa BEAST v.2.6.6 (Drummond e Rambaut 2007;
26 Bouckaert et al. 2014), onde a taxa de mutação de referência adotada foi 0.01716
27 mutação/sítio/milhões de anos (DP = 0.001). Além disso, o relógio relaxado log normal
28 e o modelo Coalescent Constant Population também foram aplicados, bem como o
29 BEAST Model Teste para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica.
30 Três execuções independentes de 50.000.000 de gerações (MCMC), com
31 amostragem a cada 1.000 gerações, foram realizadas. Por fim, a convergência das
32 cadeias foi verificada no programa TRACER v.1.7.2 (Rambaut et al. 2018) baseada

1 em valores ESS superiores a 200 (tamanho efetivo mínimo aceitável), as execuções
2 independentes foram combinadas no LOGCOMBINER, burn-in 5.000.000 (Drummond
3 e Rambaut 2007; Bouckaert et al. 2014) e a árvore de máxima credibilidade foi
4 estipulada no TREEANNOTATOR (Drummond e Rambaut 2007; Bouckaert et al.
5 2014) e visualizada no FigTree v.1.4.4 (Rambaut 2006-2018).

6 A história demográfica populacional foi inferida também no programa
7 BEAST v.2.6.6, a partir da análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP). Os
8 parâmetros adotados incluíam o modelo Coalescent Extended Bayesiana Skyline, o
9 relógio relaxado log normal, o BEAST Model Teste e a taxa mutacional de 0.01716
10 mutação/sítio/milhões de anos (DP = 0.001). Nesta análise o comprimento da cadeia
11 era de 500.000.000 (MCMC), com amostragem a cada 1.000 gerações. A
12 convergência das cadeias também foi verificada no programa TRACER v.1.7.2 e o
13 gráfico foi plotado no programa RStudio v.1.4.1717 (R core team 2018).

14 **6.3 RESULTADOS**

15 A partir do Blastn realizado no GenBank (NCBI) foi identificado uma
16 única sequência de *E. cyclothorax*, com 96,48% de similaridade (ID = KM225108.1).
17 Esta sequência contendo 597 pares de base (pb) foi utilizada como referência para o
18 alinhamento, identificação dos códons e edição das 114 sequências do gene
19 mitocondrial COI amplificadas com sucesso no presente trabalho. No final, o conjunto
20 de dados utilizado nas análises posteriores compreendia 624 pb. As sequências
21 apresentaram 92 sítios variáveis, sendo 87 deles parcimoniosamente informativos.

22 **6.3.1 Distância genética**

23 O melhor modelo de substituição nucleotídica identificado foi o TrN+1
24 (Tamura e Nei 1993), utilizado para os cálculos de distância genética. A divergência
25 de sequências no gene COI foi bastante alta, com distâncias interpopulacionais
26 variando de 1,33% a 13,69%. A maioria dos pares de populações avaliados
27 apresentaram distâncias superiores a 10%, principalmente quando comparados as
28 populações GOD, RIO e REB com as populações GUA, VIL e MAT (Tab. 2).

Tabela 2 Distâncias genéticas interpopulacionais observadas em *E. cyclothorax* baseado no modelo de evolução Tamura e Nei (1993). Em azul, valores do desvio padrão.

	GOD	GUA	VIL	MAT	RIO	REB
GOD		1,44%	1,75%	1,70%	0,83%	0,47%
GUA	11,19%		0,41%	0,42%	1,31%	1,28%
VIL	13,69%	3,13%		0,23%	1,57%	1,55%
MAT	13,44%	3,37%	1,33%		1,50%	1,50%
RIO	3,88%	10,46%	12,16%	11,60%		0,42%
REB	2,22%	10,50%	12,58%	12,19%	1,95%	

GOD: Parque Estadual Mata dos Godoy; GUA: Parque Estadual do Guartelá; VIL: Parque Estadual de Vila Velha; MAT: Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange, RIO: Parque Estadual Rio Guarani; REB: Reserva Biológica das Perobas.

1 As menores distâncias genéticas entre pares de populações foram
 2 1,33 entre VIL e MAT e 1,95% entre RIO e REB, enquanto as maiores distâncias
 3 genéticas foram 13,44% e 13,69%, entre MAT e GOD e entre VIL e GOD,
 4 respectivamente. Regionalmente, observa-se que as maiores divergências genéticas
 5 são entre populações do norte e oeste em relação as populações do leste do estado
 6 do Paraná (Tab. 2).

7 As distâncias genéticas intrapopulacionais variaram de 0,02% em
 8 GOD a 4,56% em GUA, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 Distâncias genéticas intrapopulacionais observadas em *E. cyclothorax* baseado no modelo de evolução Tamura e Nei (1993).

	d	d.p.
GOD	0,02%	0,02%
RIO	0,16%	0,10%
REB	2,04%	0,43%
GUA	4,56%	0,59%
VIL	0,49%	0,19%
MAT	1,75%	0,23%

GOD: Parque Estadual Mata dos Godoy; GUA: Parque Estadual do Guartelá; VIL: Parque Estadual de Vila Velha; MAT: Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange, RIO: Parque Estadual Rio Guarani; REB: Reserva Biológica das Perobas; d: distância intrapopulacional; d.p.: desvio padrão.

1 6.3.2 Estrutura genética

2 A Análise da Variância Molecular (AMOVA) apontou uma estrutura
3 genética alta e significativa, com forte diferenciação genética entre as populações
4 geográficas (F_{ST} global = 0,82; $p < 0,0001$) a partir do mtDNA.

5 De acordo com o F_{ST} par a par, a maioria das populações mostraram
6 diferença genética significativa entre elas, exceto quando comparadas as populações
7 VIL e MAT (0,00), GUA e MAT (0,03) e GUA e VIL (0,14) (Tab. 4). Valores altos de
8 F_{ST} principalmente entre as populações do norte e oeste quando comparadas com as
9 populações do leste também sugerem uma alta diferenciação genética populacional
10 entre essas duas regiões (*pairwise* F_{ST} variando de 0,00 a 0,98).

Tabela 4 Valores de F_{ST} entre pares de populações de *Enoploctenus cyclothorax* (*pairwise* F_{ST}).

	GOD	GUA	VIL	MAT	RIO	REB
GOD	0,00000					
GUA	0,78246	0,00000				
VIL	0,98440	0,14149*	0,00000			
MAT	0,93923	0,03278*	0,00899*	0,00000		
RIO	0,98732	0,76927	0,98501	0,93309	0,00000	
REB	0,46213	0,71579	0,93298	0,87695	0,46629	0,00000

* Coeficiente de diferenciação par a par não significativo ($p > 0,05$). GOD: Parque Estadual Mata dos Godoy; GUA: Parque Estadual do Guartelá; VIL: Parque Estadual de Vila Velha; MAT: Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange, RIO: Parque Estadual Rio Guarani; REB: Reserva Biológica das Perobas.

11 A presença de saturação foi identificada no terceiro sítio dos códons,
12 levando a retirada destes sítios do conjunto de dados, que passa a apresentar 416 pb,
13 utilizado nas análises de compartilhamento de haplótipos e filogeografia. Com isso, a
14 rede de haplótipos do mtDNA revelou nove haplótipos (H) distribuídos em dois
15 haplogrupos principais. Das seis populações amostradas, quatro possuem haplótipos
16 privados: GOD (H9), GUA (H2), MAT (H6) e VIL (H4 e H5). O haplótipo H1 foi o mais
17 frequente na linhagem 1, enquanto os haplótipos H7 e H8 foram os mais frequentes
18 na linhagem 2 (Fig. 1b). As populações das regiões norte e oeste do Paraná
19 apresentaram uma constituição haplotípica majoritariamente distinta das populações

1 da região leste (Fig. 1c), com 18 passos mutacionais entre elas.

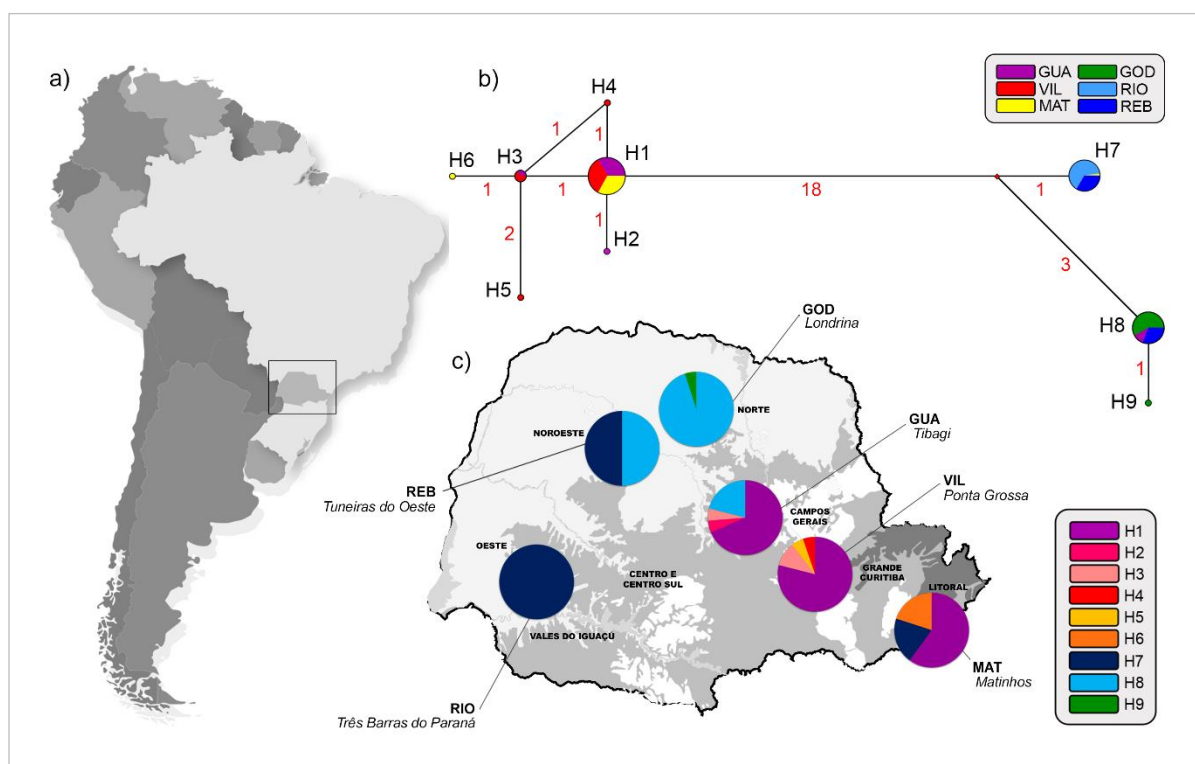


Fig. 1 Área de estudo e relações entre os haplótipos obtidos para as sequências do gene COI. (a) Mapa da América do Sul evidenciando o estado do Paraná, Brasil, região de estudo do presente trabalho. (b) Rede de haplótipos com nove haplótipos identificados. Cada nó (círculo) representa um haplótipo, que são conectados por ramos de diferentes comprimentos, dependendo do número de passos mutacionais (nucleotídeos que diferem entre os haplótipos, representados em vermelho). O tamanho dos nós são proporcionais às frequências dos haplótipos. (c) Distribuição geográfica dos haplótipos, com gráficos de pizza adjuntos aos pontos de amostragem de *E. cyclothorax*. Em (b) e (c) as cores frias representam populações do norte e oeste, enquanto as cores quentes representam populações do leste

2 6.3.3 Filogeografia e história demográfica

3 A árvore de coalescência datada revelou duas possíveis linhagens
 4 genéticas que se coalescem há aproximadamente 1 milhão e 200 mil anos atrás
 5 (tempo do ancestral comum mais recente), o que relacionaria o tempo de divergência
 6 entre elas com as oscilações climáticas do Quaternário, mais especificamente do
 7 Pleistoceno. Os haplótipos H1, H2, H3, H4, H5 e H6 estão presentes exclusivamente
 8 em indivíduos pertencentes as populações do leste do estado do Paraná (clados roxos
 9 que representam uma das linhagens). Já o haplótipo H7 (clado azul escuro) está
 10 presente majoritariamente em indivíduos de RIO e REB, enquanto os haplótipos H8 e
 11 H9 (clado azul claro) estão presentes majoritariamente em GOD e REB. Nesses
 12 últimos casos, trata-se de populações ao norte e oeste do estado, que representam
 13 outra linhagem (Fig. 2).

1 As espécies *Ctenus datus* Strand, 1909 (ID no GenBank: MW598452)
 2 e *Spinoctenus escalerete* Hazzi, Polotow, Brescovit, González-Obando & Simó, 2018
 3 (ID no GenBank: MW301881.1) foram selecionadas como grupo externo, uma vez que
 4 espécies do gênero *Ancylometes*, *A. bogotensis* (Keyserling, 1877) e *A. rufus*
 5 (Walckenaer, 1837), não se agruparam externamente ao grupo de interesse do
 6 presente estudo. As filogenias propostas por Polotow, Carmichael e Griswold (2015)
 7 e Hazzi et al. (2018) foram utilizadas para a decisão do grupo externo.

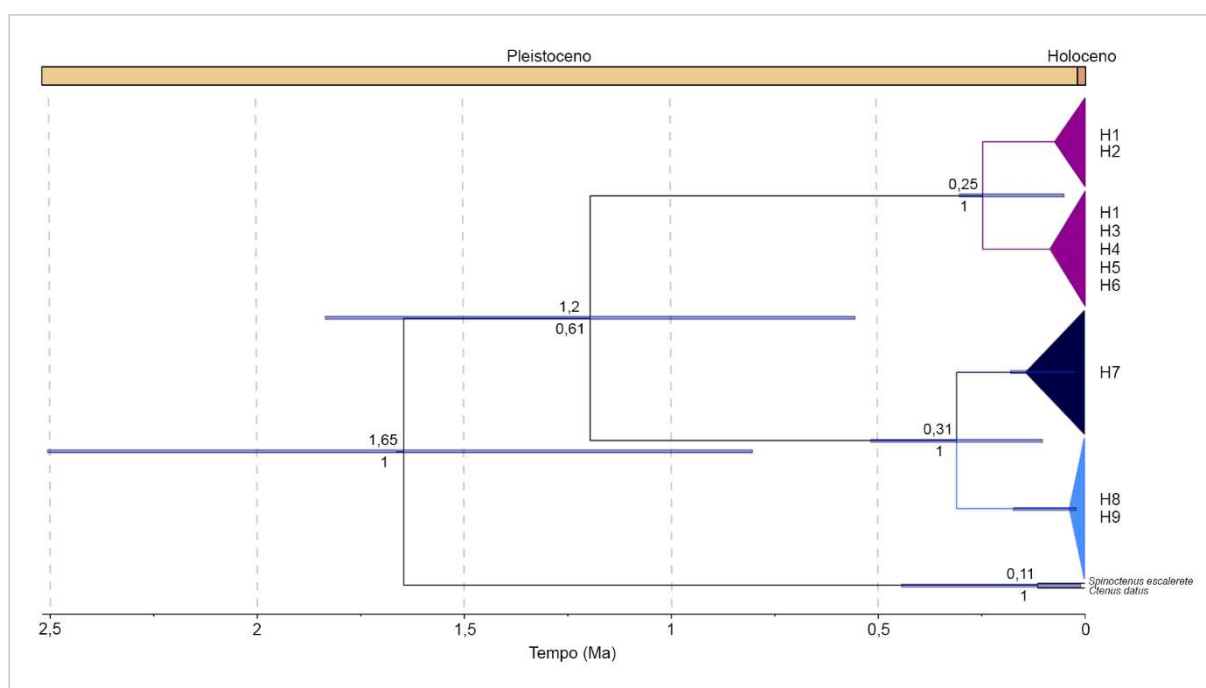


Fig. 2 Árvore de coalescência evidenciando as relações filogenéticas entre os espécimes de *Enoploctenus cyclothorax*. Nos ramos, a cima temos a idade dos nós e a baixo a probabilidade a posteriori. O intervalo de credibilidade (HPD) de 95% é representado pelas barras azuis horizontais. O primeiro clado (em roxo) agrupa os espécimes da linhagem 1, que são encontrados exclusivamente nas populações do leste. Já o segundo clado (em azul escuro e azul claro) agrupa os espécimes da linhagem 2, que são encontrados majoritariamente nas populações do norte e oeste. Por fim, o tempo de divergência é em milhões de anos (Ma)

8 Na análise da história demográfica das populações EBSP, baseada
 9 no tamanho efetivo populacional ao longo do tempo, 300 mil anos foram recuperados,
 10 revelando que provavelmente as populações de *E. cyclothorax* se mantiveram
 11 constantes/estáveis até aproximadamente 50 mil anos atrás (0,05), quando houve
 12 uma pequena expansão populacional (Fig. 3).

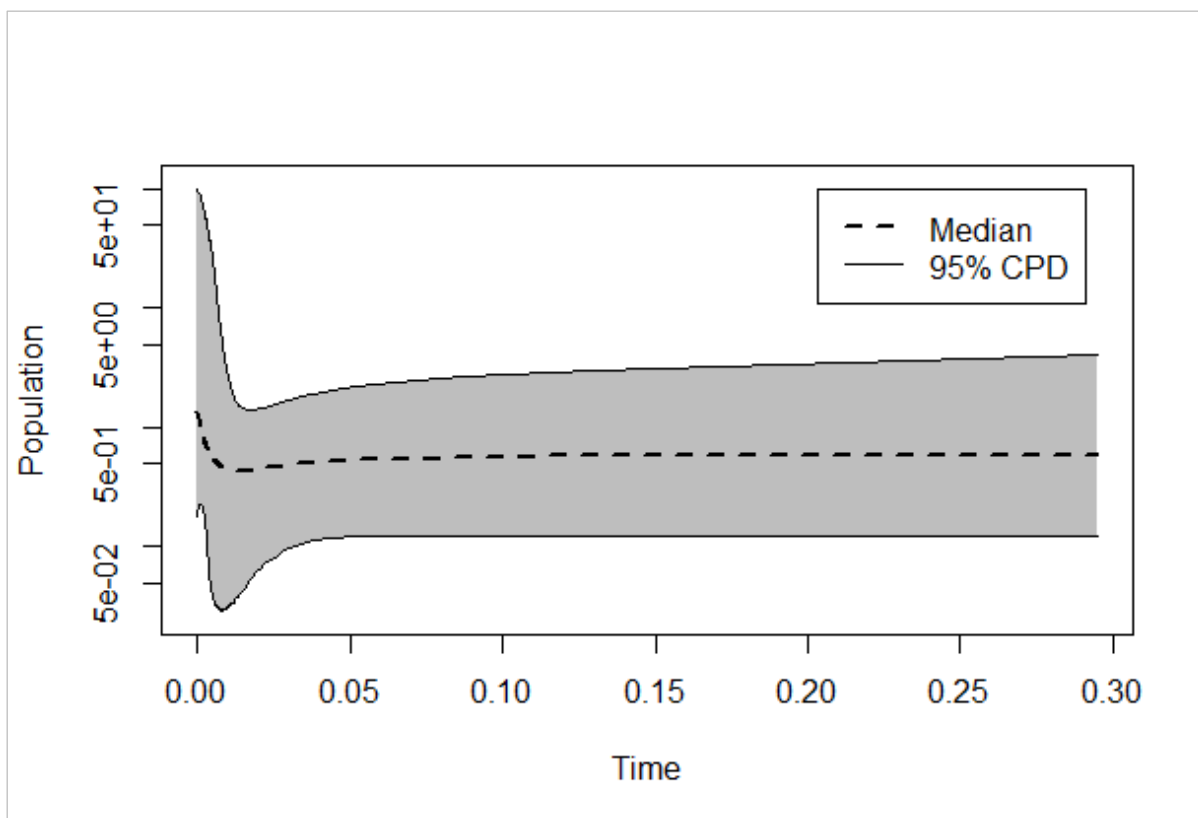


Fig. 3 Reconstrução da história demográfica ao longo do tempo para o gene COI em populações de *E. cyclothorax*, a partir da análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP), com base em informações extraídas da árvore de coalescência. No gráfico a linha tracejada indica uma estabilidade das populações ao longo do tempo, e uma leve expansão populacional há aproximadamente 50 mil anos até o presente

1 Levando em consideração a probabilidade de duas linhagens
 2 genéticas distintas em *E. cyclothorax*, o cálculo de distância genética foi novamente
 3 realizado, frisando a divergência intra e interlinhagem. Assim, foi identificada uma
 4 distância genética entre linhagens de 12,94% (d.p. = 1,59), uma distância genética
 5 dentro da linhagem 1 de 0,48% (d.p. = 0,15) e dentro da linhagem 2 de 2,04% (d.p. =
 6 0,42).

7 **6.4 DISCUSSÃO**

8 A delimitação de espécie realizada a partir das análises combinadas
 9 de distância genética, compartilhamento de haplótipos e árvore de gene evidenciaram
 10 duas linhagens genéticas distintas em *E. cyclothorax* no estado do Paraná, que se
 11 divergiram há mais de um milhão de anos atrás. A utilização de um único *locus* gênico
 12 para a delimitação de espécies pode ser validado quando uma combinação de
 13 métodos gera resultados concordantes, métodos baseados em distância, em redes

1 de haplótipos e árvores (Dellicour e Flot 2018). Assim, o mtDNA COI se mostrou uma
2 ferramenta resolutiva para a delimitação da espécie *E. cyclothorax*, que deve ser
3 utilizada na investigação do gênero como um todo.

4 As distâncias genéticas intraespecíficas observadas em *E.*
5 *cyclothorax* variaram de 0,02% em GOD a 4,56% em GUA. Com exceção de GUA,
6 todas as populações apresentaram valores mais baixos, sendo a distância
7 intraespecífica máxima de 2,04% (REB). O valor mais elevado de 4,56% observado
8 em GUA é reflexo da presença de indivíduos das duas linhagens genéticas
9 identificadas no presente trabalho, que vivem em simpatria nesta população. Terra et
10 al. (em fase de pré-publicação) identificaram indivíduos com composição genética
11 completamente distinta vivendo em GUA, por meio do software Structure (Pritchard,
12 Stephens e Donnelly 2000).

13 Já as distâncias genéticas interpopulacionais observadas variaram de
14 1,33% entre VIL e MAT a 13,69% entre VIL e GOD. Todas as distâncias genéticas
15 entre pares de populações das duas linhagens genéticas distintas ultrapassaram 10%,
16 revelando uma alta divergência genética em *E. cyclothorax* a partir do DNA *barcoding*.
17 Em Ctenidae, Henrard e Jocqué (2017) estipularam uma distância genética
18 intragenérica média de 4,5%. Recentemente, Hazzi e Hormiga (2021) avaliaram
19 divergências genéticas em três espécies de *Phoneutria*, e identificaram distâncias
20 genéticas interespecíficas ainda maiores, de 6,1% entre *P. boliviensis* (F. O. Pickard-
21 Cambridge, 1897) e *P. fera* Perty, 1833, 7,4% entre *P. boliviensis* e *P. depilata* (Strand,
22 1909) e 8,2% entre *P. fera* e *P. depilata*. As altas divergências de sequências entre
23 populações de *E. cyclothorax* ultrapassaram valores encontrados para espécies
24 distintas de um mesmo gênero, sugerindo a presença de espécie críptica no conjunto
25 de dados avaliado.

26 Gaikwad et al. (2016) e Tyagi et al. (2019) também encontraram
27 potenciais espécies crípticas em seus estudos, analisando *Plexippus paykulli*
28 (Audouin, 1826) (Salticidae), *Pardosa pusiola* (Thorell, 1891) (Lycosidae), *Cyclosa*
29 *spirifera* Simon, 1889 (Araneidae) e *Heteropoda venatoria* (Linnaeus, 1767)
30 (Sparassidae), que demonstraram altos valores de divergência de sequência
31 intraespécie, maiores que 4% (máxima: 10,09% em *P. pusiola*), associados a dois
32 clados distintos bem delimitados para os espécimes avaliados. Tyagi et al. (2019)
33 conclui propondo um limiar de delimitação de espécies entre 2,6 a 3,7% e assumem
34 que essas populações podem estar mais sujeitas a modificações genéticas do que

1 morfológicas, o que pode desencadear espécies crípticas.

2 Convencionalmente o limiar de 2% de divergência de sequência é
3 utilizado para discriminação de espécies, desde que Hebert, Ratnasingham e Waard
4 (2003) observaram divergências superiores a 2% para a maior parte dos pares de
5 espécies analisados, incluindo Arthropoda. Porém, com o desenvolvimento de novos
6 trabalhos percebeu-se que este limiar pode variar e se aproximar de 3% em diferentes
7 grupos de aranhas (Barrett e Hebert 2005; Gaikwad et al. 2016; Wang et al. 2017;
8 Tyagi et al. 2019; Ashfaq et al. 2019). Já em 2003, quando o DNA *barcoding* foi
9 estipulado como código de barras da vida animal, observou-se uma maior divergência
10 de sequências em artrópodes do que em outros filos, mais especificamente nos
11 quelicerados e crustáceos (Hebert, Ratnasingham e Waard 2003). Isso esclarece o
12 limiar de 3% ultimamente utilizado em Araneae, limiar este também adotado para a
13 delimitação de espécie no presente trabalho.

14 Duas linhagens divergentes foram recuperadas na árvore de
15 coalescência, que evidenciou dois clados monofiléticos bem suportados para *E.*
16 *cyclothorax* (probabilidade a posteriori = 1). As relações filogenéticas estabelecidas
17 nesta análise coincidem com a distribuição geográfica das duas linhagens ao longo
18 do Paraná, onde tem-se a linhagem 1 ocorrendo exclusivamente na região leste do
19 estado, enquanto a linhagem 2 ocorre majoritariamente na região norte e oeste do
20 estado (exceção de 5 indivíduos). O tempo de divergência dessas linhagens foi
21 estimado em 1 milhão e 200 mil anos atrás, data correspondente as oscilações
22 climáticas do Quaternário, mais especificamente durante o Pleistoceno. Nesta época
23 a terra passa por períodos de glaciação, com variações climáticas que impactaram
24 significativamente a distribuição espacial das florestas Atlânticas na costa brasileira
25 (Carnaval e Moritz 2008; Porto, Carnaval e Rocha 2013; Leite et al. 2016).

26 O período seco e frio do Pleistoceno tardio foi marcado pela retração
27 significativa das faixas de floresta, principalmente na porção sul da Mata Atlântica,
28 regiões abaixo do rio Doce (Carnaval e Moritz 2008). Poucas áreas de refúgio foram
29 identificadas, consideradas áreas de floresta maiores e estáveis para as espécies.
30 Carnaval e Moritz (2008) identificaram áreas de refúgio apenas na porção norte da
31 Mata Atlântica, referidas como Refúgio da Bahia e de Pernambuco. Posteriormente
32 Porto, Carnaval e Rocha (2013) identificaram mais duas áreas de refúgio neste
33 mesmo período, um deles localizado na região sudeste do Brasil. Em ambos os
34 trabalhos, fica evidente a não estabilidade de áreas do sul do país, que tiveram maior

1 impacto com relação a retração e fragmentação florestal atlântica, previstas como
2 regiões inadequadas para florestas. Desta forma, a porção sul da Mata Atlântica não
3 fornecia áreas de habitats grandes e estáveis para espécies florestais (Carnaval e
4 Moritz 2008).

5 Esta instabilidade dos habitats florestais ao sul da Mata Atlântica pode
6 estar relacionada com a forte estruturação genética identificada em *E. cyclothorax*,
7 que pode ser reflexo do isolamento reprodutivo resultante das retrações das florestas.
8 Portanto, apesar de não haver atualmente uma barreira física emergente no Paraná
9 que explique a separação das linhagens identificadas, a divergência genética e a
10 distribuição geográfica dessas linhagens podem ser explicadas pelas mudanças
11 climáticas durante o Pleistoceno, que fortemente impactaram esta região.

12 A rede de haplótipos revelou dois haplogrupos principais congruentes
13 com os dois clados encontrados na árvore de coalescência, separados por 18 passos
14 mutacionais. O compartilhamento de haplótipos se mostrou não homogêneo ao longo
15 da distribuição de *E. cyclothorax*, ocorrendo principalmente dentro de cada
16 haplogrupo, que correspondem a regiões geográficas distintas no Paraná. Seis dos
17 nove haplótipos identificados são compartilhados pelo haplogrupo composto por
18 populações do leste (cores quentes), e apenas 3 haplótipos são compartilhados pelas
19 populações do norte e oeste (cores frias). As mudanças no nível do mar durante o
20 Pleistoceno também impactaram a biodiversidade na costa brasileira, principalmente
21 com a exposição da plataforma continental. Com a queda do nível do mar, as regiões
22 de Mata Atlântica se expandiram nas regiões costeiras, especialmente durante o
23 último máximo glacial, proporcionando mais áreas de terra para expansões
24 populacionais (Leite et al. 2016). Essas regiões litorâneas detinham grande faixa de
25 floresta no Pleistoceno tardio, conseqüentemente maior biodiversidade, o que explica
26 a maior diversidade de haplótipos identificados ao leste no presente estudo.

27 Com a análise de compartilhamento de haplótipos também fica
28 evidente o isolamento das linhagens genéticas de *E. cyclothorax*, que pouco
29 compartilham alelos entre elas. Considerando a alta divergência genética entre as
30 linhagens (12,94%) que se separaram há tanto tempo, provavelmente os casos
31 isolados de compartilhamento dos haplótipos H8 e H7 entre populações de
32 haplogrupos distintos trata-se de um resquício de fluxo gênico antigo. Somado a isso,
33 vale ressaltar que a maior parte dos haplótipos são exclusivos de uma determinada
34 população, e tais haplótipos privados sugerem, portanto, baixo fluxo gênico entre

1 essas populações.

2 A AMOVA é utilizada para avaliar a quantidade de estrutura genética
3 populacional, e os altos índices de estruturação genética F_{ST} aqui identificados
4 reforçam divergência genética forte e significativa em *E. cyclothorax*, principalmente
5 entre as populações do norte e oeste quando comparadas com as populações do
6 leste, com F_{ST} par a par chegando a 0,98. Os valores de F_{ST} foram mais baixos e não
7 significativos entre pares de populações da região leste (0,00 entre VIL e MAT; 0,03
8 entre GUA e MAT; 0,14 entre GUA e VIL), onde foi detectado maior compartilhamento
9 de haplótipos. O F_{ST} global igual a 0,82 ($p < 0,0001$) foi o maior identificado em Ctenidae
10 até o momento, superando a divergência populacional de 0,66 observada entre duas
11 linhagens de *Ancylometes bogotensis* separadas pela Cordilheira Oriental dos Andes
12 colombianos (Salgado-Roa et al. 2021). Apesar de não existir uma barreira física tão
13 eminente quanto os Andes no estado do Paraná, a estruturação genética observada
14 em *E. cyclothorax* foi muito significativa, provando que outros fatores podem estar
15 envolvidos com fortes divergências genéticas em aranhas, bem como presença de
16 espécies crípticas em determinadas regiões geográficas.

17 Por fim, a história demográfica de *E. cyclothorax* revelou uma
18 estabilidade populacional ao longo dos últimos 300 mil anos aproximadamente,
19 período em que as linhagens já se apresentavam fortemente separadas, como
20 observado na árvore de coalescência. Uma leve expansão populacional coincide com
21 o final do Pleistoceno (último máximo glacial) há 50 mil anos, que se estende até o
22 presente. Leite et al. (2016) detectaram expansão de condições climáticas adequadas
23 na plataforma continental, após a sua expansão durante o último máximo glacial (~21
24 mil anos atrás), permitindo a expansão de florestas e, conseqüentemente, de
25 espécies. Vale ressaltar que esta é uma tendência geral observada, um indício do que
26 aconteceu, uma vez que a utilização de apenas um *locus* na análise EBSP é uma
27 limitação importante a ser considerada. Análises mais refinadas e precisas demandam
28 maior número de *loci*.

29 Os resultados apresentados revelam uma forte estruturação genética
30 em *E. cyclothorax*, que mantém grandes similaridades morfológicas mesmo com uma
31 alta divergência genética. Linhagens evolutivas disjuntas foram identificadas ao longo
32 do estado do Paraná, e as oscilações climáticas do Pleistoceno parecem ter
33 influenciado significativamente na definição desta estrutura. Este padrão de estrutura
34 genética e filogeográfica identificada na porção sul da Mata Atlântica é suportada por

1 diferentes metodologias que sustentam fortemente a ideia de diversidade críptica em
2 *E. cyclothorax*. É necessário que revisões taxonômicas, ecológicas e moleculares em
3 associação sejam realizadas no gênero *Enoploctenus*.

4 **AGRADECIMENTOS**

5 Os autores agradecem às UCs pela liberação das coletas; ao ICMBio;
6 à Fundação Araucária e ao Grupo Boticário, à Coordenação de Aperfeiçoamento de
7 Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de
8 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.
9 Agradecemos também a Robson Rockembacher pelo auxílio durante as coletas e a
10 Prof. Dra. Fernanda Simões de Almeida (LAGEA) pelo suporte na etapa de
11 sequenciamento do gene COI.

12 **6.5 BIBLIOGRAFIA**

- 13 Almeida FS, Fungaro MHP, Sodré LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of
14 genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae)
15 from the Tibagi River, Brazil. J. Zool 253(1):113-120.
16 <https://doi.org/10.1017/S0952836901000103>
- 17 Ashfaq M, Blagoev G, Tahir HM, Khan AM, Mukhtar MK, Akhtar S, Butt A, Mansoor
18 S, Hebert PD (2019) Assembling a DNA barcode reference library for the
19 spiders (Arachnida: Araneae) of Pakistan. PLoS One 14(5):e0217086.
20 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217086>
- 21 Ashraaf S, Tahir HM, Naseem S (2020) Assessing the diversity of Cursorial spiders
22 using DNA barcoding. Pak. J. Zool 1-10.
23 <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20180117170115>
- 24 Astrin JJ, H fer H, Spelda J, Holstein J, Bayer S, Hendrich L, Muster C, et al. (2016)
25 Towards a DNA barcode reference database for spiders and harvestmen of
26 Germany. PloS one 11(9):e0162624.
27 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162624>
- 28 Bandelt HJ, Forster P, R hl A (1999) Median-joining networks for inferring
29 intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16(1):37-48.
30 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- 31 Bandelt HJ, Forster P, R HL A (1999-2021) Network   Copyright Fluxus
32 Technology Ltd
- 33 Barrett RD, Hebert PD (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. Can. J.

- 1 Zool. 83(3):481-491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- 2 Blagoev GA, Nikolova NI, Sobel CN, Hebert PD, Adamowicz SJ (2013) Spiders
3 (Araneae) of Churchill, Manitoba: DNA barcodes and morphology reveal high
4 species diversity and new Canadian records. *BMC Ecol.* 13(1):1-17.
5 <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/13/44>
- 6 Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut
7 A, Drummond AJ (2014) BEAST 2: a software platform for Bayesian
8 evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10(4):e1003537.
9 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- 10 Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of
11 current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* 35(7):1187-1201.
12 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01870.x>
- 13 Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models,
14 new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8):772-772
- 15 Dellicour S, Flot JF (2018) The hitchhiker's guide to single-locus species
16 delimitation. *Mol Ecol Resour.* 18(6):1234-1246. [https://doi.org/10.1111/1755-](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12908)
17 [0998.12908](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12908)
- 18 Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by
19 sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7(1):1-8
- 20 Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to
21 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol*
22 *Resour.* 10(3):564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- 23 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for
24 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse
25 metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3(5):294–299
- 26 Fundação SOS Mata Atlântica (2021) Relatório Anual 2021. Fundação SOS Mata
27 Atlântica, São Paulo
- 28 Fundação SOS Mata Atlântica; INPE (2021) Atlas dos Remanescentes Florestais da
29 Mata Atlântica: período 2019-2020 relatório técnico. Fundação SOS Mata
30 Atlântica, São Paulo
- 31 Fundação SOS Mata Atlântica; INPE (2022) Atlas dos Remanescentes Florestais da
32 Mata Atlântica: período 2020-2021 relatório técnico. Fundação SOS Mata
33 Atlântica, São Paulo
- 34 Gaikwad S, Warudkar A, Shouche Y (2017) Efficacy of DNA barcoding for the
35 species identification of spiders from Western Ghats of India. *Mitochondrial*
36 *DNA Part A* 28(5):638-644. <https://doi.org/10.3109/24701394.2016.1166219>
- 37 González-Trujillo R, Correa-Ramírez MM, Ruiz-Sanchez E, Salinas EM, Jiménez

- 1 ML, García-De León FJ (2016) Pleistocene refugia and their effects on the
2 phylogeography and genetic structure of the wolf spider *Pardosa sierra*
3 (Araneae: Lycosidae) on the Baja California Peninsula. *J. Arachnol.* 44(3):3367-
4 379. <https://www.jstor.org/stable/24892353>
- 5 Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical
6 user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol.*
7 *Evol.* 27(2):221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- 8 Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate
9 large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52(5):696-704.
10 <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- 11 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
12 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- 13 Hazzi NA, Polotow D, Brescovit AD, González-Obando R, Simó M (2018)
14 Systematics and biogeography of *Spinoctenus*, a new genus of wandering
15 spider from Colombia (Ctenidae). *Invertebr. Syst.* 32(1):111-158.
16 <https://doi.org/10.1071/IS17022>
- 17 Hazzi NA, Hormiga G (2021) Morphological and molecular evidence support the
18 taxonomic separation of the medically important Neotropical spiders *Phoneutria*
19 *depilata* (Strand, 1909) and *P. boliviensis* (FO Pickard-Cambridge, 1897)
20 (Araneae, Ctenidae). *ZooKeys* 1022:13. 10.3897/zookeys.1022.60571
- 21 Hebert PD, Ratnasingham S, De Waard JR (2003) Barcoding animal life:
22 cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.
23 *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*
24 270(suppl_1):S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- 25 Henrard A, Jocqué R (2017) Morphological and molecular evidence for new genera
26 in the Afrotropical Cteninae (Araneae, Ctenidae) complex. *Zoological Journal of*
27 *the Linnean Society* 180(1):82-154. <https://doi.org/10.1111/zoj.12461>
- 28 Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular
29 evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*
30 35(6):1547. 10.1093/molbev/msy096
- 31 Leite YL, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Pardini R
32 (2016) Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges
33 refuge hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(4):1008-1013.
34 <https://doi.org/10.1073/pnas.1513062113>
- 35 Macrini CMT, Peres EA, Solferini VN (2015) Cryptic diversity of *Aglaoctenus lagotis*
36 (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest: evidence from
37 microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *J App Biol Biotech*
38 3(6):009-014. 10.7324/JABB.2015.3602
- 39 Polotow D, Brescovit AD (2014) Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider

- 1 subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). Zool. J. Linn. Soc.
2 170(2):333-361. <https://doi.org/10.1111/zoj.12101>
- 3 Polotow D, Carmichael A, Griswold CE (2015) Total evidence analysis of the
4 phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae).
5 Invertebr. Syst. 29(2):124-163. <http://dx.doi.org/10.1071/IS14041>
- 6 Porto TJ, Carnaval AC, da Rocha PLB (2013) Evaluating forest refugial models
7 using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with
8 14 Brazilian species. Divers. Distrib. 19(3):330-340.
9 <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00944.x>
- 10 Postiglioni R, Bidegaray-Batista L, Simó M, Arnedo MA (2019) Move to stay: genetic
11 structure and demographic history of a wolf spider inhabiting coastal sand
12 dunes of southern South America. System. Biodivers. 17(7):635-649.
13 <https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1689197>
- 14 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using
15 multilocus genotype data. Genetics 155(2):945-959.
16 <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- 17 R core team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R
18 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [https://www.R-](https://www.R-project.org/)
19 [project.org/](https://www.R-project.org/)
- 20 Rambaut A (2006-2018). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- 21 Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior
22 summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. Syst. Biol.
23 67(5):901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- 24 Robinson EA, Blagoev GA, Hebert PDN, Adamowicz SJ (2009) Prospects for using
25 DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. ZooKeys 16:27-46.
26 [10.3897/zookeys.16.239](http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.16.239)
- 27 Salgado-Roa FC, Gamez A, Sanchez-Herrera M, Pardo-Diaz C, Salazar C (2021)
28 Divergence promoted by the northern Andes in the giant fishing spider
29 *Ancylometes bogotensis* (Araneae: Ctenidae). Biol. J. Linn. Soc. Lond.
30 132(3):495-508. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa220>
- 31 Tanikawa A, Shinkai A, Tatsuta H, Miyashita T (2018) Highly diversified population
32 structure of the spider *Lycosa ishikariana* inhabiting sandy beach habitats.
33 Conserv. Genet. 19:255-263. [10.1007/s10592-017-0996-9](https://doi.org/10.1007/s10592-017-0996-9)
- 34 Togawa RC, Brigido MM (2003) PHPH: Web based tool for simple electropherogram
35 Quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and
36 Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto
- 37 Tyagi K, Kumar V, Kundu S, Pakrashi A, Prasad P, Caleb JT, Chandra K (2019)
38 Identification of Indian spiders through DNA barcoding: cryptic species and

1 species complex. Sci. Rep. 9(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50510-8>

3 Wang ZL, Yang XQ, Wang TZ, Yu X (2018) Assessing the effectiveness of
4 mitochondrial COI and 16S rRNA genes for DNA barcoding of farmland spiders
5 in China. Mitochondrial DNA Part A 29(5):695-702.
6 <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1350949>

7 Willemart RH, Kaneto GE (2004) On the natural history of the Neotropical spider
8 *Enoploctenus cyclothorax* (Araneae, Ctenidae). Bull. Br. arachnol. Soc.
9 13(2):53-59

10 Xia X (2017) DAMBE6: new tools for microbial genomics, phylogenetics, and
11 molecular evolution. J Hered 108(4):431-437.
12 <https://doi.org/10.1093/jhered/esx033>

13 **BIBLIOGRAFIA ON-LINE**

14 Google Earth website (2023) Disponível em: <http://earth.google.com/>. Acessado em
15 20 de janeiro de 2023

16 IAT (2023) Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/>. Acessado em 20 de janeiro de
17 2023

18 Specieslink (2023) Disponível em: <https://specieslink.net/search/>. Acessado em 13
19 de janeiro de 2023

ANEXOS

Tabela S1 Relação dos espécimes utilizados nas análises genômicas populacionais, com seus respectivos números de tombo, localidade, sexo e estágio.

COD espécime	Espécie	Sexo	Estágio	Número tombo do voucher	Localidade
248	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	283127	GOD
252	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	215872	GOD
257	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283133	GOD
258	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	215871	GOD
261	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283038	GOD
354	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283134	GOD
1609	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	247493	GOD
1610	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	247482	GOD
1611	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283120	GOD
1612	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283121	GOD
1613	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283122	GOD
1614	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283123	GOD
1615	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283124	GOD
1616	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247483	GOD
1617	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247494	GOD
1618	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283125	GOD
1619	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247484	GOD
1623	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283126	GOD
1625	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	247488	GOD
1627	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283037	GOD
1666	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282955	GUA
1669	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282938	GUA
1670	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282973	GUA
1671	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282960	GUA
1678	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282969	GUA
1679	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282942	GUA
1681	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282958	GUA
1682	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282948	GUA
1684	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282959	GUA
1685	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282972	GUA
1686	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282966	GUA
1687	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282961	GUA
1698	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282974	GUA
1699	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282956	GUA
1700	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282968	GUA
1701	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	282957	GUA
1702	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282941	GUA
1704	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282944	GUA
1707	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282954	GUA
1708	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	282943	GUA

759	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242360	VIL
762	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242363	VIL
763	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242364	VIL
798	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242517	VIL
799	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242518	VIL
801	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242532	VIL
803	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242534	VIL
812	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283135	VIL
813	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242540	VIL
814	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242541	VIL
828	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242544	VIL
829	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283039	VIL
837	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242547	VIL
864	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242561	VIL
865	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	242562	VIL
886	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242416	VIL
903	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242374	VIL
905	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242520	VIL
1048	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282996	MAT
1052	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282993	MAT
1053	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282982	MAT
1088	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	323194	MAT
1091	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	282985	MAT
1093	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283056	MAT
1094	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283057	MAT
1095	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283040	MAT
1096	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283011	MAT
1097	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282984	MAT
1098	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283058	MAT
1099	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282997	MAT
1129	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283041	MAT
1130	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283042	MAT
1131	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283059	MAT
1166	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	242133	MAT
1428	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283065	RIO
1430	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	323195	RIO
1437	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283068	RIO
1463	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283069	RIO
1467	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	283087	RIO
1468	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283070	RIO
1469	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283071	RIO
1471	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283045	RIO
1488	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283050	RIO
1489	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283051	RIO
1491	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283080	RIO

1492	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283052	RIO
1493	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283093	RIO
1494	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283081	RIO
1496	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283094	RIO
1497	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283053	RIO
1498	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283083	RIO
1499	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283095	RIO
1504	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247495	RIO
1507	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283096	REB
1515	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283104	REB
1543	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	283106	REB
1552	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	-	J	282986	REB
1553	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	A	247504	REB
1555	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283108	REB
1557	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283032	REB
1558	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283110	REB
1559	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283007	REB
1562	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283113	REB
1563	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283054	REB
1565	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283034	REB
1566	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283114	REB
1568	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283116	REB
1569	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247506	REB
1575	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283117	REB
1579	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	M	J	283118	REB
1580	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	J	283119	REB
1628	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247490	REB
1629	<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	F	A	247491	REB

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Os resultados obtidos no presente estudo oferecem novos *insights*
3 para a conservação e taxonomia de *Enoploctenus cyclothorax*, uma vez que alta e
4 significativa estruturação genética e filogeográfica foi identificada no conjunto de
5 dados avaliados.

6 A separação de *E. cyclothorax* em duas unidades evolutivas distintas
7 é sustentada por várias estatísticas aqui inferidas, tanto com o DNA nuclear quanto
8 com o DNA mitocondrial. A ideia de que modificações sutis na morfologia escondem
9 estruturas genéticas significativas na espécie é suportada pela análise do Structure
10 que identificou três grupos genéticos, pelos altos e significativos índices de F_{ST}
11 resultantes da AMOVA, redes de fluxo gênico e de haplótipos que apresentaram dois
12 grandes grupos presentes em regiões geográficas distintas, identificação de barreira
13 genética entre esses grupos, árvore de coalescência composta por dois clados bem
14 delimitados e pela elevada distância genética observada. Em conjunto, esses
15 resultados sinalizam a presença de duas linhagens genéticas distintas para *E.*
16 *cyclothorax* no estado do Paraná.

17 A combinação dos resultados inferidos a partir do COI revelaram o
18 impacto das oscilações climáticas do Pleistoceno na história evolutiva desta espécie,
19 por meio das significativas retrações florestais no bioma Mata Atlântica durante este
20 período. Os SNPs também revelaram o impacto da fragmentação populacional na
21 composição genética das populações aqui avaliadas. Esses resultados se
22 complementam e apontam prováveis fatores envolvidos no padrão atual da
23 variabilidade genética de *E. cyclothorax* no estado do Paraná, como fitofisionomia,
24 distância geográfica, desmatamento, oscilações climáticas do Pleistoceno e até
25 mesmo a própria biologia da espécie.