

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estrutura genética de populações de *Paratrechalea galianoae* (Araneae, Trechaleidae) de uma micro-bacia hidrográfica da Planície Costeira do Rio Grande do Sul.

Lucas Caetano Tieppo da Silveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientador: Sandro Luis Bonatto

Porto Alegre

Março, 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **Instituições e fontes financeiras**

Núcleo de Aracnologia do Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Laboratório de Análise Genética e Molecular do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

## Dedicatória

***"As idéias, como as pulgas, saltam de pessoa para pessoa, mas não mordem a todas."***

***Stalislaw Jerzy Lec***

***"A vida vai ficando cada vez mais dura perto do topo."***

***Friedrich Wilhelm Nietzsche***

*Ao meu grande amigo, ao meu velho. Por ter me ensinado a contestar e me apresentado à natureza. Pai, muito obrigado. Amo-te.*

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha mãe, pelo exemplo, pela educação e pela preocupação com o meu mestrado. E claro, por me emprestar a McLaren para ir a campo, mesmo que a cada volta ela apresentasse um problema a mais.

Ao professor Aldo pelo incentivo ao projeto, pela liberdade que deste à minha criatividade e, em especial, as mais diversas conversas que tivemos nos cafés da tarde. Ao Sandro agradeço pela oportunidade de colocar o meu projeto em prática, pela praticidade no dia-a-dia e por agüentar as minhas “bolas-fora”. Mais que orientadores, tive grandes mestres durante os últimos dois anos.

Aos colegas Adriano Ferreira, Ângelo Gomes, Maurício Almerão, Nicolas Mega e Pedro Brum, pela convivência, seja em campo catando algum “bicho” ou na fila do RU. Em especial, ao Luiz Ernesto Costa Schmidt, vulgo “Ernie”. Che, tu vai ganhar um vale “oportunidade da vida” de mim. Os créditos da realização desse trabalho também devem ser dados a ti. Muito obrigado por me convencer a trabalhar com esse problema, com esse organismo.

Aos colegas do monstro chamado “Genoma”. Pessoalmente, nunca me imaginei passar quase dois anos trabalhando num laboratório sem janelas. Seja pela conquista da cafeteira ou por me ensinarem tudo de bancada e programas de análises, sem vocês não teria terminado esse trabalho nem em 100 anos. Agradeço em especial aos colegas Ale “Chão-Chão”, Alice “Gallagher”, Cris “Limpa a pedra”, Déa “Network”, Fê “Palito”, Manoel “Tu é uma bicha”, Marcelo “Frenando”, Nelson “Amostrando no espaço multidimensional”, Ricardo “Sumiu o C.”, Taia “Structure” e Thomaz “Manauara”.

Aos amigos da vida, meus irmãos pra todo hora. Do Tubino, os azarados Breda Jr., Flávio e Gabi e os sortudos Balluf e Rachel. Do Lebefê, os pilateiros Bruninho e Lelê e os largados Éder e Kadu. Da graduação são muitos, mas tomo a liberdade de citar dois em especial. Ao professor Xavier, pela parceria nos jogos do Inter, nos Daibotecos, nas Psicos ou nas Horas Felizes, que foram muitas. À Pí, por tudo que tu me acrescentaste, seja na minha personalidade, ou em pessoas ao meu redor e experiências na minha vida. Agradeço também ao sem noção do Fabrício, senão ele vai ficar de cara comigo e pode estragar a minha apresentação.

Agradeço ao meu tio Aymoré e sua família. Além do conforto da casa na Barra do Ouro, para mim e alguns colegas, vocês sempre me receberam como um filho/irmão, mesmo quando eu chegava durante as férias de vocês, de surpresa, acompanhado e cheio de aranha. Nunca vou conseguir agradecer a vocês pelas inúmeras tardes no redário e noites no alpendre que tive em família.

Aos funcionários conceito 7 na Capes, Elmo e Ellen, pelos inúmeros problemas que me resolveram, seja imprimindo algum pôster ou liberando algum auxílio. À Cladi, por todos os puxões de orelha que tornam possível o trabalho no Genoma.

Por fim, restam muitas pessoas que me ajudaram a chegar até aqui. Seja formando bandos mistos de ataque (cada um no seu nicho), jogando bola, colocando colírio nos meus olhos, marcando imunes, fazendo apostas, assando um churras, servindo de estepe, esvaziando garrafas, comemorando um gol do colorado, dando uma caminhada interminável ou viajando para algum lugar todos que passaram ou estão na minha vida somaram a este trabalho. Muito obrigado a vocês. Muito obrigado à vida.

## Índice

<b>Resumo</b>	<b>pág. 7</b>
<b>Abstract</b>	<b>pág. 8</b>
<b>Introdução</b>	<b>pág. 9</b>
<b>Capítulo Um</b>	<b>pág. 16</b>
<b>Capítulo Dois</b>	<b>pág. 20</b>
<b>Conclusão</b>	<b>pág. 52</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>pág. 55</b>

## Resumo

Pertencentes à família Trechaleidae (Araneae), as aranhas da espécie *Paratrechalea galianoae* tem grandes requerimentos quanto à seleção do seu hábitat e só são encontradas na vegetação ciliar de rios de primeira ordem. Por essa razão, a sua distribuição geográfica na micro-bacia do rio Maquiné é fragmentada. O objetivo deste trabalho foi testar se esta estruturação geográfica causa estruturação genética entre as populações que se encontram na micro-bacia e destas com populações ao seu redor. Foram isolados e caracterizados doze locos de marcadores de microssatélites polimorficos para a espécie, através da construção de uma biblioteca genômica enriquecida. Destes doze, nove foram usados para estudar a diversidade molecular nuclear dos indivíduos e a diversidade mitocondrial foi estudada com um segmento do gene CO1. Os índices de diversidade moleculares, tanto nucleares como mitocondriais, encontrados na espécie condizem com o padrão geral de aranhas e não há qualquer evidência de eventos de redução ou aumento demográficos fortes na região. Os resultados, em especial dos microssatélites, sugerem a existência de três populações na amostra, apesar do baixo valor de diferenciação médio entre os pontos. Os cinco pontos amostrais incluídos na micro-bacia do rio Maquiné constituem uma única população, enquanto os pontos amostrais da FLONA e de Pedras Brancas, de outras micro-bacias, são populações independentes. Apesar da baixa taxa de dispersão observada a campo nos adultos, os indivíduos jovens apresentam todas as características necessárias para a realização de *ballooning*, comportamento de dispersão via aérea com o uso de fios de seda. Tal comportamento já foi utilizado para explicar homogeneizações genéticas em grande escala, mas também é possível que o *ballooning* seja praticado em vôos de pequenas distâncias e que vales de rios sejam utilizados como corredores de dispersão, assim homogeneizando as populações em escala fina também.

## Abstract

Belonging to the family Trechaleidae (Araneae), the spiders of the *Paratrechalea galianoae* species have great requirements for their habitat selection and are only found in the riparian vegetation of first order streams. For this reason, their geographical distribution in micro-basin of the Maquiné River is fragmented. This study aims to test whether this geographical structure is reflected in a genetic structure between the populations of the micro-basin and among these and the population in the surrounding area. We isolated and characterized twelve polymorphic *loci* of microsatellites markers, using an enriched genomic library. From these twelve, nine were used to survey the nuclear molecular diversity of the individuals and the mitochondrial diversity was measure using a CO1 sequence. The molecular diversity indexes, both nuclear and mitochondrial, found in this species were in agreement with the general standard of spiders and was not found any evidence of stronger events of demographic reduction or increase in this region. Our results, in particular those from microsatellites, suggest the existence of three population in the sample, despite the low average value of differentiation. The five sampling points include in the micro-basin of Maquiné River are only one population, while the sampling points of FLONA and Pedras Brancas, from other micro-basin, are different populations. Despite the low adults dispersion rate observed in field, the spiderlings have all characteristics necessary for performances ballooning, aerial dispersion behavior with the use of silk. Such behavior has already been used to elucidate the genetic homogenization in great geographic scales, but it is possible that the ballooning is held in flights of short distances and the rivers valleys are used as dispersion corridors, so homogenizing the population in fine-scale as well.

## **Introdução**

## Organismo de estudo

Composta por mais de 40.000 espécies distribuídas em cerca de 3.700 gêneros (Platnick 2009), a ordem Araneae tem a quinta maior diversidade do planeta. Essa grande diversidade específica foi alcançada graças à variedade de hábitos das aranhas. Embora o padrão comportamental seja prioritariamente de animais predatórios, esse padrão é atingido a partir das mais distintas estratégias etológicas e fisiológicas. Se por um lado existem espécies de aranhas com longas expectativas de vida e hábitos solitários, as quais só têm contato com outros indivíduos durante o período reprodutivo, por exemplo, as espécies do gênero *Promyrmekiaphila* estudadas por Stockman & Bond (2007), por outro é possível encontrar espécies com ciclo de vida anual, grande proles e hábitos sub-sociais (Viera *et al.* 2006). Além deste exemplo, variações no comportamento sexual, podendo-se encontrar inclusive casos onde ocorre inversão dos papéis sexuais (Aisenberg *et al.* 2007); nas estratégias de caça, no emprego da seda e até mesmo na composição da dieta, recentemente a espécie *Bagheera kiplingi* foi descrita como “vegetariana”, dado o fato que mais de 90% da sua alimentação provêm de folhas de acácia (Meehan *et al.* 2008); levam a esse grande número de espécies dentro do grupo.

*Paratrechalea galianoae* Carico 2005 (figura 1) é uma aranha pertencente à família Trechaleidae e apresenta hábito semi-aquático, sendo encontrada principalmente associada à vegetação ripária de riachos de primeira ordem. A sua área de ocorrência tem como limite norte o estado de Minas Gerais e o como limite sul o estado do Rio Grande do Sul, ambos no Brasil. Longitudinalmente, a sua distribuição segue desde a Mata Atlântica no litoral brasileiro até a província de Misiones no norte da Argentina (Carico, 2005; Silva *et al.*, 2006). Nesta mesma região geográfica se encontram as espécies *P. azul* e *P. ornata*.



**Figura 1** Fêmea (à esquerda) e macho (à direita), com presente nupcial, de *Paratrechalea galianoae*

Além da simpatria com respeito à distribuição geográfica, estas espécies de *Paratrechalea* também compartilham outras características importantes biologicamente. A cripticidade morfológica é muito alta e as únicas estruturas que podem ser usadas na diagnose destes indivíduos são as genitálias, tanto o epígeno feminino como os palpos masculinos (Carico 2005, Silva *et al.* 2006). A cripticidade etológica também é muito grande. As três espécies apresentam hábito prioritariamente noturno, refugiando-se durante o dia entre os seixos do rio ou na vegetação ripária; e solitário, apesar da alta densidade em que as populações se encontram. A capacidade de caça é alta e a dieta dos adultos é composta por pequenos artrópodes, em especial insetos da ordem Ephemeroptera (observações de campo). Mas aquele que possivelmente seja o comportamento que mais chama atenção é a construção de um presente nupcial e o oferecimento destes às fêmeas pelos machos. O comportamento sexual (pré- e copulatório) de *P. azul* e *P. ornata* é detalhadamente descrito por Costa-Schmidt *et al.* 2008) e esta descrição é válida também para *P. galianoae*. Resumidamente, após a captura de uma presa pelo macho, esta é enrolada em seda e carregada pelo mesmo nas quelíceras. O macho então parte em busca de uma fêmea, e uma vez que a encontra adota uma característica posição para o ofertamento do presente nupcial. Se aceito pela fêmea, esta adota posição igualmente característica e também prende o presente nupcial com as suas quelíceras. Após isso, segue-se a cópula, com inserções alternadas do palpo do macho na fêmea. Comportamento semelhante a esse só tinha sido

registrado para a espécie de aranhas *Pisaura mirabilis* (Austad & Thornhill 1986; Stalhandske 2001, 2002; Bilde et al. 2006, 2007; Vahed 2007; entre outros), espécie que ocorre na Europa e este registro feito por Costa-Schmidt *et al* (2008) foi o primeiro para aranhas neotropicais. Tal comportamento também pode representar uma barreira/etapa para a identificação específica entre os indivíduos, por exemplo, na estimulação da produção do presente pelo macho ou no aceite deste pela fêmea (Albo *et al.* 2009), uma vez que adultos de *P. azul* e *P. ornata* são comumente encontrados sintopicamente.

Quanto às características comportamentais e ecológicas que diferem *P. galianoae* das outras espécies do gênero, aquelas relacionadas à escolha e uso do habitat são as que mais chamam atenção. Primeiramente, enquanto adultos de *P. galianoae* ocorrem somente em rios de primeira ordem, vulgarmente conhecidos como “riachos de cabeceira”, os adultos das demais espécies ocorrem em rios de maior porte. “Riachos de cabeceira” podem ser brevemente descritos como cursos de água relativamente estreitos (entre um e cinco metros de largura), rasos e íngremes, usualmente associados a encostas de morros e montanhas. Esta pequena largura está associada a uma maior cobertura vegetal sobre o rio, resultando em uma maior umidade relativa, e menor incidência solar direta e a temperatura local. Estas podem ser as condições microclimáticas fundamentais para a ocorrência de adultos de *P. galianoae*. Outro ponto divergente entre as espécies do gênero é o uso do habitat pelos adultos. Em *P. azul* e *P. ornata* os adultos são usualmente encontrados entre os seixos do rio e em *P. galianoae* os adultos são encontrados na vegetação ripária, mesmo durante atividades como caça ou reprodução.

### **Área de Estudo**

Situada no limite meridional da Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica *stricto sensu*), a micro-bacia do rio Maquiné compreende cerca de 550km<sup>2</sup> das encostas da Serra Geral, e está alojada numa região de transição entre a Mata Atlântica, a Mata de Araucária e os Campos de Cima da Serra. O clima da região é caracterizado como Cfa, ou subtropical úmido, segundo Köppen, com temperatura

média anual de 18°C e sem estação seca (pluviosidade anual média 1.400-1.800 mm) (Moreno 1961; Nimer 1990; Becker *et al* 2004). A variação altimétrica é muito grande, indo de 40 metros na parte “baixa” até quase 1.000 metros no “alto” do vale.

O Maquiné é o principal rio da micro-bacia, com quase 40 km de extensão e com as suas nascentes localizadas próximo ao município de São Francisco de Paula, no arroio Lajeado. Além deste, formam o rio Maquiné os arroios Garapiá, Forqueta, Ligeiro, Encantado e Solidão, pela margem esquerda, e o rio do Ouro e arroios Pinheiro e Água Parada pela margem direita. A FEPAM (2000) e a CIB *et al.* (2000) consideram essa área como particularmente interessante para a conservação. Ainda, a UNESCO reconhece que devido à exuberância natural e a diversidade de espécies da fauna e flora, esta é uma “Reserva da Biosfera da Mata Atlântica”. Devido a todos esses fatores, a micro-bacia do rio Maquine têm sido alvo de estudos em diversas áreas de conhecimento durante os últimos anos.

### **Aranhas e Marcadores Moleculares**

O uso de marcadores moleculares para responder questões ecológicas e evolutivas tem aumentado nos últimos anos, devido ao alto conteúdo informativo destes e ao avanço do poder das análises (Selkoe & Toonen 2006). A partir desta metodologia é possível estimar vários parâmetros interessantes, como taxas de migração, tamanhos populacionais, relações de parentesco, efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*), estrutura populacional, dentre outros (Pearse & Crandall 2004).

Inúmeros estudos com aranhas têm se valido destes métodos. Seqüências de genes mitocôndrias e nucleares têm sido empregadas na construção de filogenias das mais diversas famílias dentro de Araneae (Hedin 2001; Maddison & Hedin 2003; Arnedo *et al.* 2004; Bond 2004; Croucher *et al.* 2004, Paquin & Hedin 2004). Mesmo com respeito aos trabalhos de filogenia baseados em marcadores moleculares é possível mostrar a riqueza desta abordagem. Por exemplo, muitos trabalhos visam elucidar as relações evolutivas entre espécies crípticas, onde apesar da acentuada semelhança morfológica é possível se encontrar grandes divergências genéticas (Bond *et al.* 2001). Stockman & Bond (2007) estudaram as relações de espécies-irmãs do gênero *Promyrmekiaphila* na Califórnia e encontraram uma grande

divergência entre as seqüências (média de 9,0%). Por outro lado, a filogenia dos grandes grupos de aranhas foi realizada prioritariamente com base em caracteres morfológicos (por exemplo, Griswold *et al.* 1999) e hoje está sendo testada/validada com o uso de técnicas moleculares, como no trabalho de Spagna & Gillespie (2008) com o clado “RTA”, o qual inclui cerca de 18.000 espécies de aranhas que apresentam a apófise tibial retrolateral nos palpos dos machos.

No nível específico são inúmeros os estudos filogeográficos. Sistemas insulares, como os arquipélagos do Havaí e das ilhas Canárias (Gillespie *et al.* 1994, Roderick & Gillespie 1998, Bidegaray-Batista *et al.* 2007), e sistemas continentais, como Austrália, China e Califórnia, (Evans & Goodisman 2002, Chang *et al.* 2007, Starret & Hedin 2007) já foram estudados por diferentes grupos de pesquisa. Entretanto, quanto aos trabalhos de genética de populações em pequena escala o número de trabalhos disponíveis na bibliografia é muito mais reduzido. De fato, até onde nós sabemos, apenas o trabalho de Vandergast *et al.* (2004) abordou questões de estruturação em pequena escala. Ainda cabe ressaltar que dentre os estudos com aranhas que empregam marcadores moleculares, não há nenhum com microssatélites (ou STR, *single tandem repeat*), exceto os quais descrevem *primers* destes para diferentes espécies (Rütten *et al.* 2001, Ji *et al.* 2004, Bilde *et al.* 2009). Estes marcadores são os mais utilizados para estudos ecológicos (Schlötterer 2004; Selkoe & Toonen 2006) e correspondem a regiões genômicas repetidas em *tandem*, de um a seis nucleotídeos, encontradas em altas freqüências no genoma da maioria dos táxons (Selkoe & Toonen 2006). Estas regiões variam no número de repetições, variação causada devido a erros da DNA polimerase durante a replicação que ocasionam o acréscimo ou a diminuição de uma repetição. Estes erros têm a sua taxa aumentada devido à seqüência repetitiva. Esta variação no número de repetições é muito grande, o que possibilita a realização de inferências no nível individual e populacional (Ellegren 2004).

### **Objetivo Geral**

Os requerimentos micro-ambientais dos indivíduos de *P. galianoae* e as características da cobertura vegetal da micro-bacia do rio Maquiné resultam em uma

distribuição disjunta das populações desta espécie na micro-bacia. Essa aparente estruturação demográfica, se real, pode resultar numa estruturação genética das populações. O objetivo geral deste estudo é identificar a presença ou não de tal estrutura genética entre as populações de *P. galinae* e com base nesse resultado inferir hipóteses que expliquem o padrão atual com base em processos antigos e/ou recentes.

### **Objetivos específicos**

1. Desenvolver e testar marcadores moleculares de microssatélites para *P. galinae*, visando aumentar a gama de marcadores disponíveis para estudos ecológicos e evolutivos com as espécies do gênero.
2. Quantificar a diversidade genética das populações de *P. galinae*, com o uso de marcadores STR e de mtDNA, na micro-bacia do rio Maquiné e arredores, indentificando a variação intra- e interpopulacionais.
3. Descrever a estrutura genética das populações de *P. galinae* na micro-bacia do rio Maquiné e arredores.
4. Elaborar hipóteses de processos ecológicos e evolutivos que expliquem a estrutura genética encontrada nas aranhas *P. galinae* da micro-bacia do rio Maquiné, sejam eles causadores de divergência ou de homogeneização genética.

**Capítulo Um: Isolation and characterization of 12  
dinucleotide microsatellite loci in *Paratrechalea  
galianoae* (Araneae, Trechaleidae), a nuptial gift-spider**

(Artigo publicado no periódico *Molecular Ecology Resouces*)







**Capítulo Dois: Estrutura genética de populações de  
*Paratrechalea galianoae* (Araneae, Trechaleidae) da  
micro-bacia do rio Maquiné, Rio Grande do Sul, Brasi**

(Artigo a ser submetido ao periódico *Molecular Ecology*)

1 **Estrutura genética de populações de *Paratrechalea galianoae* (Araneae,**  
2 **Trechaleidae) da micro-bacia do rio Maquiné, Rio Grande do Sul, Brasil**

3

4 Lucas Caetano Tieppo da Silveira<sup>1</sup>, Sandro L. Bonatto<sup>2</sup>, Aldo M. de Araújo<sup>1</sup>

5

6 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de  
7 Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

8 <sup>2</sup> Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do  
9 Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

10

11 *Palavras-chave:* *Ballooning*, Estrutura Genética, Microsatélites, mtDNA,  
12 *Paratrechalea galianoae*.

13

14 *Título reduzido:* Estrutura genética de *P. galianoae*.

15

## Resumo

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

As aranhas da espécie *Paratrechalea galianoae* tem a sua distribuição fragmentada na micro-bacia do rio Maquiné devido a restrições ecológicas na seleção de hábitat, sendo encontradas apenas associadas à vegetação ripária de rios de primeira ordem. A estruturação geográfica pode causar diferenças na diversidade genética das populações deste organismo na micro-bacia e arredores. Com o uso de locos de STR e de mtDNA, nós avaliamos a existência de tal estruturação genética. Os índices de diversidade moleculares, tanto nucleares como mitocondriais, encontrados na espécie condizem com o padrão geral de aranhas e não há qualquer evidência de eventos de redução ou aumento demográficos fortes na região. Apesar do baixo valor de diferenciação médio entre os pontos amostrais os resultados, em especial dos microsatélites, sugerem a existência de três populações na amostra. Os cinco pontos amostrais incluídos na micro-bacia do rio Maquiné constituem uma única população, enquanto os pontos amostrais da FLONA e de Pedras Brancas, de outras micro-bacias, são populações independentes. Apesar da baixa taxa de dispersão observada a campo nos adultos, os indivíduos jovens apresentam todas as características necessárias para a realização de *ballooning*, comportamento de dispersão via aérea com o uso de fios de seda. Tal comportamento já foi utilizado para explicar homogeneizações genéticas em grande escala, mas também é possível que o *ballooning* seja praticado em vôos de pequenas distâncias e que vales de rios sejam utilizados como corredores de dispersão, assim homogeneizando as populações em escala fina também.

39 **Introdução**

40

41 *Paratrechalea galianoae* Carico 2005 (Araneae, Trechaleidae) é uma  
42 aranha cursorial/solitária de hábito semi-aquático sendo encontrada associada à  
43 vegetação ripária, com distribuição no sul e sudeste do Brasil e norte da Argentina  
44 (Carico 2005, Silva *et al.* 2006). Junto com *P. azul* e *P. ornata*, apresenta um  
45 complexo comportamento de cortejo sexual, o qual inclui a construção e o  
46 oferecimento de presentes nupciais pelos machos às fêmeas (Costa-Schmidt *et*  
47 *al.* 2008), fato este pela primeira vez identificado em espécies neotropicais. O  
48 presente é composto por uma presa, usualmente um inseto, envolta em seda, e o  
49 seu real significado inter sexual ainda não foi bem esclarecido (Albo *et al.* 2009).  
50 Dentre as possíveis hipóteses para a explicação deste comportamento em  
51 aranhas estão as de que (I) o presente representa uma defesa/prevenção do  
52 macho a ataques das fêmeas, (II) um esforço do macho na cópula, (III) uma  
53 armadilha sensorial para facilitar a cópula, ou (IV) um investimento paternal na  
54 prole (Vahed 1998, Sakaluk 2000, Stålhandske 2001, Bilde *et al.* 2007).  
55 Ecologicamente, estas espécies de *Paratrechalea* divergem em dois importantes  
56 pontos (LCTS, observações de campo). O primeiro ponto é que os juvenis deste  
57 gênero são encontrados principalmente associados à vegetação ripária, enquanto  
58 os adultos são encontrados entre os seixos no rio, exceto em *P. galianoae* onde  
59 os adultos apresentam hábito semelhante aos juvenis, e continuam associados à  
60 vegetação. O segundo ponto é que enquanto os adultos de *P. galianoae* são  
61 encontrados somente em riachos de primeira ordem, os adultos de *P. azul* e *P.*  
62 *ornata* são encontrados em riachos e rios de maior porte. Esse requerimento  
63 quanto ao habitat parece estar relacionado à necessidade de uma maior  
64 cobertura vegetal e da sua conseqüente maior umidade relativa, menor incidência  
65 solar direta e/ou menor temperatura.

66 Nos últimos anos, têm se utilizado cada vez mais marcadores moleculares  
67 para responder questões ecológicas e evolutivas devido ao alto conteúdo de  
68 informação presentes nesses e ao avanço das análises (Selkoe & Toonen 2006).  
69 Ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas em estudos com  
70 aranhas. Estudos de filogenia foram conduzidos nas mais diversas famílias (Hedin

71 2001; Maddison & Hedin 2003; Arnedo *et al.* 2004; Bond 2004; Croucher *et al.*  
72 2004, Paquin & Hedin 2004) e nos mais diversos níveis taxonômicos. Por  
73 exemplo, Stockman & Bond (2007) estudaram as relações de um grupo de  
74 espécies-irmãs (gênero *Promyrmekiaphila*) da Califórnia, enquanto Spagna &  
75 Gillespie (2008) fizeram o mesmo no clado “RTA”, no qual estão incluídas cerca  
76 de 18.000 espécies de aranhas. Dentre os trabalhos intra-específicos, são muito  
77 comuns os trabalhos de filogeografia. Diferentes espécies de aranhas foram alvos  
78 de estudos tanto em sistemas insulares, por exemplo, nos arquipélagos do Havaí  
79 (Gillespie *et al.* 1994, Roderick & Gillespie 1998) e das ilhas Canárias (Bidegaray-  
80 Batista *et al.* 2007), como em sistemas continentais, por exemplo, na China  
81 (Chang *et al.* 2007) e no sudeste asiático (Su *et al.* 2007). Quanto aos trabalhos  
82 com estrutura populacional em fina escala, até onde sabemos, só existe um artigo  
83 disponível na bibliografia atual. Vandergast *et al.* (2004) utilizaram três espécies  
84 de *Tetragnatha* e a fragmentação florestal ocasionada por um fluxo de lava para  
85 testar diferentes hipóteses relacionadas à estrutura genética destas populações.  
86 Com respeito ao tipo de marcador molecular utilizado, as mais diversas regiões  
87 gênicas ou intergênicas, mitocondriais ou nucleares, já foram seqüenciadas e  
88 utilizadas. Quanto ao emprego de marcadores codominantes, somente  
89 marcadores de alozimas têm sido empregados, e ao que nos consta este é o  
90 primeiro trabalho que emprega microssatélites (STR, *short tandem repeat*) em  
91 estudos de genética de populações de aranhas.

92 A micro-bacia do rio Maquiné se situa na planície costeira do Rio Grande  
93 do Sul (RS) e compreende uma área de aproximadamente 550 km<sup>2</sup> das encostas  
94 da Serra Geral. Devido o encontro de várias formações fitoecológicas, esta pode  
95 ser considerada uma área de tensão ecológica (Becker *et al.* 2004). Compõem  
96 esse mosaico a Mata Atlântica, a Mata de Araucária e os Campos de Cima da  
97 Serra, além de grande área de lavoura e pastagem. Dada essa característica da  
98 paisagem da micro-bacia do rio Maquiné, associada às exigências micro-  
99 ambientais do organismo, as áreas de ocorrência das populações de *P. galianoae*  
100 são encontradas dispersas em fragmentos, ocasionando uma aparente  
101 estruturação geográfica/ecológica. Se essa premissa for verdadeira, é possível

102 que esta distribuição disjunta ocasione diferentes padrões de variabilidade  
103 genética entre pontos dentro da micro-bacia.

104 Este trabalho tem como objetivo testar a existência de estruturação  
105 genética nas populações de *P. galianoae* na micro-bacia do rio Maquiné. Para  
106 isso, serão usados dados da seqüência de DNA mitocondrial (mtDNA) e locos  
107 nucleares de microssatélites para medir o nível da estruturação genética de modo  
108 a correlacionar estes a fragmentação do habitat. Este é o primeiro trabalho, que  
109 temos conhecimento, que aborda esse tipo de problema com aranhas  
110 neotropicais.

111

## 112 **Materiais e Métodos**

113

### 114 *Área de Estudo e Amostragem*

115

116 Durante o ano de 2007 foram realizadas coletas de indivíduos de *P.*  
117 *galianoae* em cinco pontos amostrais dentro da micro-bacia do rio Maquiné, todos  
118 situados no município de Maquiné/RS (figura 1). Os pontos escolhidos foram;  
119 Cascata da Forqueta (CF, n°1, 29°31'59"S 50°12'06"O), Encantada (ENC, n°2,  
120 29°36'28"S 50°12'14"), Linha Pinheiro (LP, n°3, 29°40'08"S 50°16'07"O), Rio do  
121 Ouro (RO, n°4, 29°35'55"S 50°18'19"O) e Seu Sícino, arroio Pedra de Amolar  
122 (SS, n°5, 29°32'22"S 50°15'08"O). Além destes pontos também foram coletados  
123 indivíduos em pontos ao redor da micro-bacia do rio Maquiné, nos municípios de  
124 São Francisco de Paula/RS, na FLONA (FL, n°6, 29°25'57"S 50°22'23"O), e em  
125 Itati/RS, na localidade de Pedras Brancas (PB, n°7, 29°23'34"S 50°02'24"O). Os  
126 indivíduos foram identificados com o uso de um estereomicroscópio Nikon  
127 SMZ600 através da morfologia das genitálias feminina, o epígino, e masculina, os  
128 palpos. Após a confirmação da espécie, os indivíduos foram mantidos vivos até  
129 momentos antes da extração de DNA.

130 *Extração de DNA e condições de amplificação para diferentes marcadores*

131

132 A extração de DNA dos tecidos foi realizada com o uso do protocolo de  
133 CTAB descrito por Mega & Revers (em preparação). A confirmação do sucesso  
134 da extração foi realizada por conferência em gel de agarose 1X.

135 Para investigar a diversidade molecular de *P. galianoae* foram usados nove  
136 locos polimórficos de microssatélites; A1, B2, B4, C1, D2, D4, F1, F2 e H2;  
137 descritos por Silveira & Bonatto (2009). As condições de amplificação e  
138 genotipagem foram as mesmas usadas no referido trabalho, apenas variando o  
139 *primer* marcado com fluorescência para a realização de genotipagens múltiplas  
140 (*multiplex*). As fluorescências empregadas em cada loco são apresentadas na  
141 tabela 1.

142 A diversidade genética mitocondrial foi estudada através do  
143 seqüenciamento de parte do gene Citocromo Oxidase C subunidade 1 (CO1) de  
144 91 indivíduos de *P. galianoae*. Inicialmente foram utilizados os *primers* C1-J-1718  
145 (Simon *et al.* 1994) e C1-N-2776 (Hedin & Maddison 2001), porém devido à  
146 problemas de amplificação e seqüenciamento este último foi substituído por um  
147 *primer* desenhado a partir de uma seqüência obtida de *P. galianoae* (5'-AAA GGA  
148 AAC CAG TAA GTA ATT CCA G-3') (este estudo). As reações de PCR foram  
149 realizadas no termociclador MJ Research PTC-200, com volume total de 20 µl,  
150 composto por aproximadamente 30 ng de DNA, tampão de PCR 1X, 0,2 µM de  
151 cada *primer*, 0,2 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq *Platinum*  
152 (Invitrogen®) e H<sub>2</sub>O Mili-q para o volume. As amplificações foram conferidas em  
153 gel de agarose 1X e estas foram consideradas bem sucedidas quando o produto  
154 se encontrava em uma concentração superior a 100 ng/µl. Os produtos foram  
155 purificados com acetato de amônio para posterior seqüenciamento no MegaBACE  
156 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare®). A confirmação da qualidade da  
157 seqüência foi realizada manualmente no programa CHROMAS 2.0 (disponível em  
158 [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)) e o alinhamento destas no programa BIOEDIT (Hall  
159 1999). Não foi detectada variação de tamanho nas seqüências obtidas.

## 160 *Análises dos Microssatélites*

161

162 As análises sumárias como riqueza alélica ( $A$ ), heterozigosidade esperada  
163 ( $H_e$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foram realizadas no programa GENEPOP  
164 3.2 (Raymond & Rousset 1995). Este programa também foi utilizado para estimar  
165 desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (1.000 *batches* com 10.000  
166 interações por *batch*) e testar se os diferentes pares de locos estavam em  
167 desequilíbrio de ligação gamética. Devido ao fato de que os testes de desvio do  
168 EHW envolvem um grande número de comparações para cada loco, nós  
169 ajustamos a probabilidade crítica de cada teste usando a correção de Bonferroni,  
170 visando manter o nível de significância de 0,05 ( $P_{ajustado}=0,0071$ ). O mesmo  
171 procedimento foi realizado para o teste de desequilíbrio de ligação gamética entre  
172 os pares de locos, onde para se manter o nível de significância de 0,05 foi usado  
173 um  $P_{ajustado}$  igual a 0,00139. Alelos nulos, alelos que não são amplificados devido  
174 à ocorrência de mutações na região correspondente aos *primers*, têm sido  
175 evocado como um dos grandes problemas relacionados às análises envolvendo  
176 microssatélites (Shaw *et al.* 1999). Para evitarmos a utilização de locos com esse  
177 problema, nós estimamos a frequência de alelos nulos e testamos a significância  
178 desta no programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

179 Diversas análises de estruturação populacional foram realizadas. A análise  
180 AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) possibilitou a inferência da variação genética entre  
181 os pontos amostrais. Também foram realizadas análises de estruturação par-a-  
182 par entre os pontos amostrais (neste procedimento, realizou-se correção de  
183 Bonferroni,  $P_{ajustado}=0,00238$ ), e após essas, refinou-se a análise AMOVA,  
184 hierarquizando grupos de pontos amostrais mais semelhantes entre si (ou  
185 distintos dos demais). Todas essas análises foram realizadas com os índices  $F_{ST}$   
186 (Weir & Cockerham 1984) e  $R_{ST}$  (Slatkin 1995), e implementadas no programa  
187 ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). O uso de ambos índices de estruturação  
188 se deve ao fato de que, nem sempre os marcadores moleculares de  
189 microssatélites se comportam segundo o modelo de mutação passo-a-passo  
190 (*stepwise mutation model*) (Gaggiotti *et al.* 1999), e ainda existem controvérsias  
191 quando ao melhor método de análise de conjuntos de dados de microssatélites

192 (Pearse & Crandall 2004). Neste mesmo programa foram calculados índices  
193 relacionados a sinais de eventos demográficos diferenciais entre os pontos  
194 amostrais (Theta H e índice de Garza-Williamson). Análises bayesianas de  
195 agrupamento populacional foram realizadas nos programas STRUCTURE  
196 (Pritchard *et al.* 2000) e TESS (Chen *et al.* 2007). Segundo Chen *et al.* (2007), a  
197 combinação das análises destes programas oferece uma conveniente maneira de  
198 detectar a estrutura populacional no espaço e localizar discontinuidades nas  
199 frequências alélicas. No STRUCTURE foram analisados os agrupamentos K= 1-7,  
200 com 100.000 interações de aquecimento da cadeia (*burn-in*) e 200.000 interações  
201 na cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), enquanto no TESS se testou K= 2-7  
202 (não é possível testar K= 1) com 10.000 interações de aquecimento da cadeia e  
203 50.000 interações na cadeia. Para a interpretação dos resultados do TESS, as  
204 30% melhores corridas para cada K foram analisadas no programa CLUMPP  
205 (Jakobsson & Rosenberg 2006), onde se calculou o índice H'.

206

#### 207 *Análises Genéticas com CO1*

208

209 Os índices de polimorfismos das seqüências, como o número de sítios  
210 segregantes (S), o número de transições e transversões; e os testes de  
211 neutralidade das seqüências, D de Tajima (Tajima 1989) e Fs de Fu (Fu 1997),  
212 foram realizados no programa ARLEQUIN 3.11. O gráfico da distribuição dos  
213 *mismatches* foi obtido no programa DNASP 4.50.2 (Rozas *et al.* 2003). A distância  
214 média entre as seqüências foi calculada no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*  
215 2007) usando o modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura 1980).

216 Análises AMOVA e de  $F_{ST}$  par-a-par foram realizadas no programa  
217 ARLEQUIN 3.11, de maneira semelhante aquelas realizadas com os marcadores  
218 de microssatélites. Inicialmente, realizou-se uma análise AMOVA sem  
219 estruturação alguma, visando verificar o nível de variação genética entre os  
220 pontos amostrais. Em seguida, análises de  $F_{ST}$  par-a-par foram realizadas com o  
221 objetivo de identificar os pontos amostrais mais divergentes, objetivando refinar a  
222 análise de AMOVA, a qual foi novamente realizada com novos níveis  
223 hierárquicos. Estas análises foram realizadas tanto com base nas distâncias dos

224 haplótipos, sob o modelo de Kimura-2-parâmetros, como com base apenas nas  
225 frequências haplotípicas (estatística F tradicional). No programa MEGA 4 foi  
226 estimada a árvore evolutiva usando o método de Neighbour-Joining (Saitou & Nei  
227 1987), segundo o modelo evolutivo de Kimura-2-parâmetros. A rede de  
228 haplótipos, calculada com o algoritmo de Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999),  
229 referente ao gene CO1 de *P. galianoae* foi calculada no programa NETWORK  
230 4.5.1.0 (disponível em [www.fluxus-technology.com/](http://www.fluxus-technology.com/)).

231

## 232 **Resultados**

233

### 234 *Microssatélites e a Variação Genética Intra e Inter-populacional*

235

236 Dos 144 indivíduos estudadas inicialmente, 141 foram utilizados nas  
237 análises a seguir. A exclusão dos demais indivíduos se deve ao fato de possuírem  
238 mais de 50% de dados faltantes. A riqueza alélica dos locos de microssatélites  
239 variou entre seis e dezoito alelos, com uma média de 10,33 alelos por loco. O  
240 número total de alelos foi 93, sendo que destes 26 eram exclusivos a alguma  
241 população. As heterozigosidades esperadas ( $H_e$ ) e observadas ( $H_o$ ) variaram  
242 entre 0,654-0,853 e 0,29-0,734, com médias de 0,727 e 0,580, respectivamente.  
243 (tabela 1). O ponto amostral da localidade de Pedras Brancas apresentou as  
244 menores  $H_e$  e  $H_o$  médias, respectivamente 0,646 e 0,535, enquanto as maiores  
245 médias foram encontradas na localidade da FLONA, sendo  $H_e$  média de 0,754 e  
246  $H_o$  média de 0,641 (tabela 2). Dos nove locos, dois (A1 e F2) tiveram o EHW  
247 rejeitado em mais da metade das populações e o programa MICRO-CHECKER  
248 revelou probabilidade significativa de presença de alelos nulos, e por esta razão  
249 estes locos foram retirados das análises posteriores. Nos outros locos, não foram  
250 encontrados padrões de desvio do EHW ou presença de alelos nulos que  
251 justificassem essa exclusão. Nenhuma combinação de pares de locos apresentou  
252 evidências de desequilíbrio de ligação gamético. O índice G-W médio dos pontos  
253 amostrais variou entre 0,756 (Seu Sícino) e 0,892 (Rio do Ouro) e o Theta H  
254 variou entre 1,57 (Pedras Brancas) e 2,08 (FLONA) (tabela 2).

255 As análises AMOVA baseadas em  $R_{ST}$  e  $F_{ST}$  indicaram que a variação  
256 entre pontos amostrais corresponde a 4,37% e 2,48%, respectivamente  
257 ( $P < 0,001$ ). A divergência populacional, medida com comparações par-a-par  
258 (tabela 3) de  $F_{ST}$  foi significativa quando os pontos amostrais da FLONA e de  
259 Pedras Brancas estavam envolvidas nas comparações (oito comparações das 21  
260 possíveis), mas com valores baixos ( $F_{ST} < 0,1$ ). Os resultados obtidos com o uso  
261 do  $R_{ST}$ , apesar de apresentarem valores relativamente maiores, tiveram menos  
262 comparações estatisticamente significativas, apenas quatro e todas relacionadas  
263 ao ponto amostral da localidade de Pedras Brancas. A análise de AMOVA  
264 estruturada em três grupos; sendo as amostras da FLONA e de Pedras Brancas  
265 um grupo cada uma e as demais amostras o terceiro grupo; seguiram um padrão  
266 semelhante, onde os maiores percentuais de variação foram encontrados quando  
267 se utilizou o modelo de  $R_{ST}$ . A porcentagem da variação presente entre os grupos  
268 hierárquicos foi de 7,31% usando o modelo  $R_{ST}$ , e de 4,65% usando  $F_{ST}$ , ambos  
269 com  $P < 0,05$ .

270 As análises de agrupamento realizadas no programa STRUCTURE  
271 indicaram que o número de grupos mais provável para o conjunto amostral é dois.  
272 Entretanto, o coeficiente de associação populacional (*membership*) dos indivíduos  
273 tende a ser dividido entre as duas populações, isto é, a maioria dos indivíduos foi  
274 alocada ao redor de 50% em cada população, e não houve correspondência  
275 geográfica entre os indivíduos de um mesmo ponto amostral e as populações  
276 definidas pelo programa (figura 2). Os resultados do TESS, posteriormente  
277 analisados no CLUMPP, também indicaram uma alta probabilidade de  $K=2$   
278 ( $H' = 0,9918$ ), sendo o segundo  $H'$  mais alto igual a 0,9197, referente à  $K=3$ .  
279 Porém, é importante notar que o programa TESS não realiza busca para  $K=1$ .  
280 Este alto índice  $H'$  para  $K=2$ , e a grande diferença dele para os demais pode ser  
281 um indicativo de que o  $K$  mais baixo seja o verdadeiro. Além disto, mesmo para  
282  $K=2$ , o mesmo padrão observado no STRUCTURE pode ser encontrado no  
283 TESS. O coeficiente de associação populacional para os indivíduos também  
284 tendeu a 50% para cada população inferida. Por fim, não há correspondência  
285 geográfica entre os indivíduos inferidos como de uma mesma população. Assim,  
286 acreditamos que  $K=1$  seja a melhor escolha dentre as possíveis.

287

288 CO1 - Análises de Polimorfismo e Estruturação

289

290 Foram obtidos 25 haplótipos a partir de 91 seqüências de *P. galianoae*.  
291 Dos 428 pares de base (pb) obtidos, trinta e três eram polimórficos, sendo o  
292 número médio de nucleotídeos diferentes entre seqüências (k) de 8,838. A  
293 seqüência é composta por 68,68% de A-T e entre as mutações, 24 eram  
294 transições e 14 eram transversões, e nenhum *indel* foi encontrado. Para a espécie  
295 como um todo o índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) estimada foi de 0,02054.  
296 Índices de diversidade por população são apresentados na tabela 4. Os testes de  
297 neutralidade não indicaram qualquer sinal de que as seqüências tenham evoluído  
298 sobre pressões seletivas, o D de Tajima foi igual a 1,12146 (P=0,895) e o Fs de  
299 Fu foi -1,18509 (P=0.387). Dentre os 428 pb, três sítios apresentaram dados  
300 faltantes e foram excluídos das análises seguintes. O  $\theta$  calculado foi igual a  
301 0,02047.

302 Tanto a árvore de NJ (não apresentada) como a rede de haplótipos (figura  
303 2) não apresentaram sinal de estruturação ou clados com correspondência  
304 geográfica bem definidos. A rede de haplótipos apresentou um padrão  
305 interessante, com os haplótipos mais comuns bastante divergentes, localizados  
306 em posição mais terminal, e compartilhados entre muitos pontos amostrais. Os  
307 haplótipos privados de modo geral tinham freqüências muito baixa. O gráfico de  
308 distribuição dos *mismatch* da seqüência foi multimodal, ou seja, não apresentou  
309 sinais de expansão populacional recente.

310 As porcentagens de variação obtidas a partir das AMOVA globais foram de  
311 14,21% quando se levou em conta a distância entre as seqüências, e 12,39%  
312 quando se levou em conta somente as freqüências haplotípicas (ambas P<0,001).  
313 Seis comparações de  $F_{ST}$  par-a-par foram significativas estatisticamente com o  
314 uso de ambos os métodos (tabela 5). Apesar de ocorrer alguma variação nas  
315 comparações que foram significativas entre os métodos, chama atenção que as  
316 populações da FLONA e de Linha Pinheiro estiveram envolvidas na grande  
317 maioria destas comparações significativas (onze de doze), mas não diferiram  
318 entre si. Ao se realizar a AMOVA hierárquica agrupando-se essas populações

319 num mesmo grupo os percentuais de variação entre os grupos foram de 9,66% e  
320 12,06%, métodos de distância e de frequência respectivamente, porém estes  
321 valores não foram significativos. Outros agrupamentos também foram testados,  
322 mas não são apresentados, pois apresentaram baixos percentuais de variação  
323 e/ou não foram significantes estatisticamente.

324

## 325 **Discussão**

326

### 327 *Diversidade molecular*

328

329 A seqüência mitocondrial CO1 foi predominantemente composta por A-T  
330 (68,68%). Este padrão na composição de seqüências mitocondriais em aranhas já  
331 fora descrito anteriormente em outras espécies, como por exemplo, *Tetragnatha*  
332 spp. (Gillespie *et al* 1994), *Dysdera lancerotensis* (Bidegaray-Batista *et al.* 2007),  
333 *Pardosa astrigera* (Chang *et al.* 2007), *Nephila pilipes* (Su *et al.* 2007) e várias  
334 espécies da sub-família Dentryohantinae (Salticidae) (Hedin & Maddison 2001). A  
335 distância média entre as seqüências de CO1 em *P. galianoae* é superior aquela  
336 encontrada em espécies do gênero *Tetragnatha* (Vandergast *et al.* 2004) em área  
337 semelhante à estudada aqui. Enquanto em *P. galianoae*, a distância média entre  
338 os pares de seqüências foi de 2,1%, em *T. anuenue*, *T. brevignatha* e *T.*  
339 *quasimodo* foi de 1,0%, 0,8% e 1,5% respectivamente. Esta diferença pode estar  
340 relacionada ao fato de que as populações de *Tetragnatha* utilizadas no referido  
341 estudo haviam sofrido um *bottleneck* recente, enquanto as populações de *P.*  
342 *galianoae* do nosso estudo não apresentam sinal algum de drástica diminuição  
343 populacional (ver adiante). Ainda, a distância média de 2,1% está dentro dos  
344 intervalos comumente descritos para variação molecular mitocondrial em aranhas;  
345 por exemplo, 0,1-12,6% em *Aptosticus simus* (Bond *et al.* 2001) e 0.1-14.3% no  
346 complexo *Promyrmekiaphila* (Stockman & Bond 2007).

347 Nosso estudo revelou altos níveis de variabilidade genética nos locos  
348 microssatélites de *P. galianoae*, pouco maiores aos encontrados por Ji *et al*  
349 (2004) e Rütten *et al* (2001) para outras espécies de aranhas. A riqueza alélica  
350 encontrada por Bilde *et al* (2009) para *Stegodyphus lineatus* foi

351 consideravelmente menor, porém pode ser explicado pelo fato de que esta  
352 espécie apresenta hábito sub-social, e possivelmente a taxa de endocruzamento  
353 seja muito alta.

354

#### 355 *Análises de Estruturação Populacional*

356

357 Nossos dados mostram claramente que a aparente estruturação ecológica  
358 existente entre os adultos de *P. galianoae* não apresenta correspondência  
359 genética dentro da micro-bacia do rio Maquiné. As análises de AMOVA global  
360 apresentaram índices de estruturação significativos com ambos marcadores,  
361 entretanto os valores atingidos com o uso de marcadores de STR ( $F_{ST}=0,02$  e  
362  $R_{ST}=0,04$ ) são consideravelmente menores àquele obtido a partir da seqüência  
363 CO1 ( $F_{ST}=0,14$ ). A discrepância na magnitude de tal variação entre os  
364 marcadores (até 7X) pode ser explicada por vários fatores, como por exemplo, o  
365 Ne quatro vezes menor do mtDNA em relação aos loci autossômicos, o que  
366 geralmente implica um uma maior estruturação geográfica (Avice 2000). Outro  
367 possível fator envolvido nesta diferença é a existência de fluxo gênico diferencial  
368 entre os sexos, pois em espécies onde machos dispersem mais que fêmeas  
369 podem apresentar haplótipos de mtDNA vinculados historicamente à certas  
370 regiões geográficas. Finalmente, alguns autores sugerem que a taxa de mutação  
371 dos locos de STR, substancialmente maior do que a taxa do mtDNA, pode  
372 resultar em homoplasias no tamanhos dos alelos, levando a dificuldades na  
373 obtenção de estimativas acuradas de diferenciação populacional (revisão em  
374 Zakharov e Hellmann 2007).

375 Apesar da variação genética encontrada entre os pontos amostrais, é  
376 possível descartar a estruturação dentro da micro-bacia do rio Maquiné devido  
377 aos resultados encontrados nas comparações par-a-par. Com o uso de  
378 marcadores de microssatélites as populações que apresentaram diferenças  
379 significativas foram exatamente aquelas situadas fora da micro-bacia, os pontos  
380 amostrais da FLONA e de Pedras Brancas. Interessantemente, as populações da  
381 FLONA e de Pedras Brancas foram as populações com maior e menor riqueza  
382 alélica, respectivamente. A análise de AMOVA estruturada realizada

383 posteriormente confirma a diferenciação entre estes e os pontos amostrais dentro  
384 da micro-bacia, uma vez que a porcentagem de variação entre os grupos acabou  
385 aumentando. Ou seja, os pontos amostrais dentro da micro-bacia constituem uma  
386 única população enquanto cada ponto amostral fora desta representam outras  
387 populações. Assim, é possível concluir que as micro-bacias funcionam como  
388 “unidades geográficas” para a definição de populações.

389 Quanto à população da FLONA, além do alto índice de diversidade alélica,  
390 ocorrem muitos alelos únicos. Dos 19 alelos únicos encontrados na amostra,  
391 cinco eram oriundos deste ponto amostral, o que contribui para a sua  
392 diferenciação (este número de alelos únicos difere do anteriormente apresentado,  
393 pois foi realizada a exclusão de dois locos, ver resultados). Ainda cabe trazer a  
394 esta discussão os resultados referentes às comparações de  $F_{ST}$  par-a-par com o  
395 marcador mitocondrial (CO1). Novamente, a população da FLONA foi responsável  
396 por grande parte (quase a metade) das comparações estatisticamente  
397 significativas. Curiosamente, a população da FLONA apresentou somente dois  
398 haplótipos. Um deles é o haplótipo mais freqüente e compartilhado entre as  
399 populações, enquanto o outro vem a ser o mais divergente e talvez aquele com  
400 estruturação geográfica mais clara. Este segundo é compartilhado entre a  
401 população da FLONA e os pontos amostrais dentro da micro-bacia mais próximos  
402 a esta (Seu Sícínio, Rio do Ouro e Linha Pinheiro, em ordem crescente). O ponto  
403 amostral de Linha Pinheiro também apresentou algumas comparações  
404 estatisticamente significativas na análise de  $F_{ST}$  par-a-par com o marcador CO1,  
405 embora não seja claro o porquê dessa diferenciação. Já a população de Pedras  
406 Brancas teve quatro alelos únicos de microssatélites e apresentou altos índices  
407 de estruturação nas comparações par-a-par.

408 Infelizmente, os estudos de estruturação genética em aranhas são raros ao  
409 nível populacional, sendo mais numerosos ao nível filogeográfico mais amplo e  
410 com marcadores mitocondriais. Entre os estudos recentes realizados na área, é  
411 ponto comum que a história de vida das espécies é o fator predominante no nível  
412 de estruturação das aranhas. São inúmeros os exemplos com espécies com  
413 pouca dispersão e altos índices de estruturação. A espécie sub-social *Diaea*  
414 *ergandros*, estudada por Evans & Goodisman (2002), apresentou altos índices de

415 endocruzamento (como esperado) e de estruturação entre as localidades (cerca  
416 de vinte quilômetros entre elas), apesar de que nesta espécie os ninhos não  
417 sejam formados exclusivamente por indivíduos relacionados. Espécies de  
418 *mygalomorphas* da Califórnia, EUA, são alvos de estudos há muitos anos (por  
419 exemplo, Ramirez & Froehlig 1997, Bond *et al.* 2001, 2006, Hedin & Wood 2002,  
420 Ramirez & Chi 2004, Starrett & Hedin, 2007), e em muitos destes a conclusão é  
421 semelhante. Devido à pequena capacidade de dispersão destes organismos,  
422 mesmo quando jovens, o nível de estruturação costuma ser alto entre as  
423 populações e muitos destes trabalhos indicam a existência de espécies crípticas,  
424 tamanha a divergência genética entre as populações. Um exemplo muito claro da  
425 importância da história de vida na estrutura genética pode ser encontrada em  
426 Vandergast *et al* (2004), que trabalhando com diferentes espécies de *Tetragnatha*  
427 demonstrou a resposta diferencial destas a um mesmo evento de fragmentação  
428 recente. Mesmo com baixos índices de diversidade genética (entre 0,8% e 1,5%  
429 de divergência entre seqüências) foi possível demonstrar que nas espécies mais  
430 restritas ecologicamente (no caso, *T. anuenue*) existe uma maior estruturação  
431 genética. Por outro lado, recente estudo de Su *et al* (2007) com *Nephila pilipes*  
432 testou a influência das mudanças climáticas do quaternário na estruturação  
433 genética desta espécie encontrada no sudeste asiático e, apesar da escala  
434 continental do estudo e da descontinuidade do hábitat, os autores não  
435 encontraram nenhum forte sinal de estruturação genética. Nesta espécie, apesar  
436 do grande tamanho corporal e do hábito sedentário dos adultos, que vivem  
437 associados a teias, acredita-se que os juvenis sejam capazes de dispersar pelo  
438 ar, por meio de *ballooning*, pois apresentam todas as características necessárias  
439 para esse comportamento (Foelix, 1996). Essa possível capacidade dispersora da  
440 espécie, associada à dinâmica das monções na região, seria a força responsável  
441 pela homogeneização genética de diferentes populações desta espécie.  
442 Interessantemente, o padrão filogeográfico desta espécie é semelhante ao do  
443 presente estudo, tal como a diferenciação média entre as seqüências que foi de  
444 1,6% é similar ao 2,1% de *P. galianoae*.

445         Apesar dos adultos de *P. galianoae* apresentarem um tamanho corporal  
446 que impossibilitaria a prática de *ballooning* (segundo Schneider *et al* [2001] “a

447 probabilidade de tal comportamento como uma função do tamanho corporal das  
448 aranhas rapidamente se aproxima de zero quando a massa corporal excede um  
449 mg”), os juvenis da espécie apresentam as principais características que  
450 possibilitam a realização de *ballooning*. Os indivíduos dos primeiros ínstaes são  
451 muito pequenos e poderiam facilmente dispersar via aérea. Além disso, durante  
452 os primeiros estágios de desenvolvimento as aranhas são capazes de viver com  
453 as reservas do corpo e não precisam forragear por um longo período (Foelix  
454 1996). Uma vez que as principais restrições ao hábito são superadas é possível  
455 hipotetizar que *P. galianoae* apresente tal comportamento, apesar de ainda não  
456 ter sido observado. Essa possibilidade vem ao encontro de constatações de  
457 outros trabalhos e com os resultados apresentados neste. Dispersão via aérea é  
458 uma estratégia chave na história de vida de muitas espécies de aranhas, por  
459 exemplo, espécies pioneiras ou com habitat fragmentado (Wolley *et al.* 2007).  
460 Além disso, assume-se de forma usual que a dispersão por *ballooning* é realizada  
461 em poucos e longos vôos, entretanto tem sido proposto que de fato ocorrem  
462 vários e curtos vôos (revisão em Thorbek *et al.* 2002), e este fato poderia  
463 influenciar na estrutura genética das populações em uma escala geográfica  
464 pequena. Finalmente, outro traço relacionado ao comportamento de *ballooning*  
465 que pode influenciar a miscigenação dos pontos amostrais da micro-bacia do rio  
466 Maquiné é que os vales de rios têm sido identificados como corredores de  
467 dispersão por *ballooning* (revisão em Walter *et al.* 2005).

468           **Referências Bibliográficas**

469

470 Albo MJ, Costa-Schmidt LE, Costa FG (2009) To feed or to wrap? Female silk  
471 cues elicit male nuptial gift construction in a semiaquatic trechaleid spider.  
472 *Journal of Zoology*, doi:10.1111/j.1469-7998.2008.00539.x

473 Arnedo MA, Coddington J, Agnarsson I, Gillespie RG (2004) From a comb to a  
474 tree: phylogenetic relationships of the comb-footed spiders (Araneae,  
475 Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular*  
476 *Phylogenetics and Evolution* **31**, 225–245.

477 Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard  
478 University Press, Cambridge, Massachusetts.

479 Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring  
480 intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.

481 Becker FG, Irgang GV, Hasenack H, Villela FS, Verani NF (2004) Land cover and  
482 conservation state of a region in the southern limit of the atlantic forest (river  
483 Maquiné basin, Rio Grande do Sul, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* **64**,  
484 569-582.

485 Bidegaray-Batista L, Macía-Hernández N, Oromí P, Arnedo MA (2007) Living on  
486 the edge: demographic and phylogeographical patterns in the woodlouse-  
487 hunter spider *Dysdera lancerotensis* Simon, 1907 on the eastern volcanic  
488 ridge of the Canary Islands. *Molecular Ecology* **16**, 3198-3214.

489 Bilde T, Tuni C, Cariani A, Santini A, Tabarroni C, Garoia F, Goodacre L (2009)  
490 Characterization of microsatellite loci in the subsocial spider *Stegodyphus*  
491 *lineatus* (Araneae: Eresidae). *Molecular Ecology Resources* **9**, 128–130.

492 Bilde T, Tuni C, Elsayed R, Pekár S, Toft S (2007) Nuptial gifts of male spiders:  
493 sensory exploitation of the female's maternal care instinct or foraging  
494 motivation? *Animal Behaviour* **73**,267–273.

495 Bond J (2004) Systematics of the Californian eucenizine spider genus *Apomastus*  
496 (Araneae: Mygalomorphae: Cyrtaucheniidea): the relationships between  
497 molecular and morphology taxonomy. *Invertebrate Systematics* **18**, 361-376.

- 498 Bond J, Beamer DA, Lamb T, Hedin M (2006) Combining genetic and geospatial  
499 analyses to infer population extinction in mygalomorph spiders endemic to  
500 the Los Angeles region. *Animal Conservation* **9**, 145-157.
- 501 Bond J, Hedin M, Ramirez M, Opperl B (2001) Deep molecular divergence in the  
502 absence of morphological and ecological change in the Californian coastal  
503 dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology* **10**, 899-  
504 910.
- 505 Carico JE (2005) Descriptions of two new spider genera of Trechaleidae (Araneae,  
506 Lycosoidea) from South America. *Journal of Arachnology* **33**, 797-812.
- 507 Chang J, Song D, Zhou K (2007) Incongruous nuclear and mitochondrial  
508 phylogeographic patterns in two sympatric lineages of wolf spider *Pardosa*  
509 *astrigera* (Araneae, Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and*  
510 *Evolution* **42**, 104-121.
- 511 Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms  
512 ascertaining spatial population structure: a new computer program and a  
513 comparison study. *Molecular Ecology Notes* **7**, 747–756.
- 514 Costa-Schmidt LE, Carico JE, Araújo AM (2008) Nuptial gifts and sexual behavior  
515 in two species of spider (Araneae, Trechaleidae, *Paratrechalea*).  
516 *Naturwissenschaften* **95**, 731–739.
- 517 Croucher PJP, Oxford GS, Searle JB (2004) Mitochondrial differentiation,  
518 introgression and phylogeny of species in the *Tegenaria atrica* group  
519 (Araneae: Agelenidae). *Biological Journal Linnean Society* **81**, 79–89.
- 520 Evans TA, Goodisman MAD (2002) Nestmate relatedness and population genetic  
521 structure of the Australian social crab spider *Diaea ergandros* (Araneae:  
522 Thomisidae). *Molecular Ecology* **11**, 2307-2316.
- 523 Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software  
524 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*  
525 *Online* **1**, 47-50.
- 526 Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred  
527 from metric distances among DNA haplotypes: Application to human  
528 mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- 529 Foelix RF (1996) *Biology of spiders*. Oxford University Press, New York.

- 530 Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,  
531 hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- 532 Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddon (1999) A comparison of two indirect  
533 methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data.  
534 *Molecular Ecology* **9**, 1513-1520.
- 535 Gillespie RG, Croom HB, Palumbi SR (1994) Multiple origins of a spider radiation  
536 in Hawaii. *Proceedings of National Academy of Science* **91**, 2290-2294.
- 537 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and  
538 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **41**,  
539 95-98.
- 540 Hedin M (2001) Molecular insights into Species Phylogeny, Biogeography, and  
541 Morphological Stasis in the Ancient Spider Genus *Hypochilus* (Araneae:  
542 Hypochilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 238-251.
- 543 Hedin M, Maddison WP (2001) A combined molecular approach to phylogeny of  
544 the jumping spider subfamily *Dendryphantinae* (Araneae: Salticidae).  
545 *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 386-403.
- 546 Hedin M, Wood DL (2002) Genealogical exclusivity in geographically proximate  
547 populations of *Hypochilus thorelli* Marx (Araneae, Hypochilidae) on the  
548 Cumberland Plateau of North America. *Molecular Ecology* **11**, 1975-1988.
- 549 Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and  
550 permutation program for dealing with label switching and multimodality in  
551 analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801–1806.
- 552 Ji Y, Smith H, Zhang D, Hewitt GM (2004) Ten polymorphic microsatellite DNA loci  
553 for paternity and population genetics analysis in the fen raft spider  
554 (*Dolomedes plantarius*). *Molecular Ecology Notes* **4**, 274-276.
- 555 Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base  
556 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal*  
557 *of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- 558 Maddison WP & Hedin M (2003) Phylogeny of *Habronattus* jumping spiders  
559 (Araneae: Salticidae), with preliminary consideration of genitalic and  
560 courtship evolution. *Systematic Entomology* **28**, 1-21.

- 561 Paquin P, Hedin M (2004) The power and perils of "molecular taxonomy": a case  
562 study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas  
563 caves. *Molecular Ecology* **13**, 3239-3255.
- 564 Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond  $F_{ST}$ : analysis of population genetic data  
565 for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 585-602.
- 566 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of a population structure  
567 using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- 568 Ramirez MG, Chi B (2004) Cryptic speciation, genetic diversity and gene flow in  
569 the California turret spider *Atypoides riversi* (Araneae: Antrodiaetidae).  
570 *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 27-37.
- 571 Ramirez MG, Froehlig JL (1997) Minimal genetic variation in a coastal dune  
572 arthropod: The trapdoor spider *Aptostichus simus* (Cyrtaucheniidae).  
573 *Conservation Biology* **11**, 256–259.
- 574 Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics  
575 software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- 576 Roderick GK, Gillespie RG (1998). Speciation and phylogeography of Hawaiian  
577 terrestrial arthropods. *Molecular Ecology* **7**,519-531.
- 578 Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA  
579 polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*  
580 **19**, 2496–2497.
- 581 Rütten KB, Schulz I, Olek K, Uhl G (2001) Polymorphic microsatellite markers in  
582 the spider *Pholcus phalangioides* isolated from a library enriched for CA  
583 repeats. *Molecular Ecology Notes* **1**, 255-257.
- 584 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for  
585 reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**,406-  
586 425.
- 587 Sakaluk SK (2000) Sensory exploitation as an evolutionary origin to nuptial food  
588 gifts in insects. *Proceedings of the Royal Society B* **267**,339–343.
- 589 Schneider JM, Roos J, Lubin Y, Henschel JR (2001) Dispersal of *Stegodyphus*  
590 *dumicola* (Araneae, Eresidae): They do balloon after all! *Journal of*  
591 *Arachnology* **29**, 114-116.

- 592 Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologist: a practical guide for  
593 use and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- 594 Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR (1999) Subtle population structuring within a  
595 highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*,  
596 demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 407–  
597 417.
- 598 Silva ELC, Lise AA, Buckup EH, Brescovit AD (2006) Taxonomy and new records  
599 in the Neotropical spider genus *Paratrechalea* (Araneae, Lycosoidea,  
600 Trechaleidae). *Biociências* **14**, 71-82.
- 601 Silveira LCT, Bonatto SL (2009) Isolation and characterization of 12 dinucleotide  
602 microsatellite loci in *Paratrechalea galianoae* (Araneae, Trechaleidae), a  
603 nuptial gift-spider. *Molecular Ecology Resources* **9**, 539–541.
- 604 Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution,  
605 weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a  
606 compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the*  
607 *Entomological Society of America* **87**, 651–701.
- 608 Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite  
609 allele frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.
- 610 Spagna JC, Gillespie RG (2008) More data, fewer shifts: Molecular insights into  
611 the evolution of the spinning apparatus in non-orb-weaving spiders. *Molecular*  
612 *Phylogenetics and Evolution* **46**, 347–368.
- 613 Stålhandske P (2001) Nuptial gift in the spider *Pisaura mirabilis* maintained by  
614 sexual selection. *Behavioral Ecology* **12**, 691–697.
- 615 Starrett J, Hedin M (2007) Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species  
616 and biogeographic complexity in the California turret spider *Antrodiaetus*  
617 *riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology* **16**, 583-604.
- 618 Stockman AK, Bond JE (2007) Delimiting cohesion species: Extreme population  
619 structuring and the role of ecological interchangeability. *Molecular Ecology*  
620 **16**, 3374-3392.
- 621 Su YC, Chang YH, Lee SC, Tso IM (2007) Phylogeography of the giant wood  
622 spider (*Nephila pilipes*, Araneae) from Asian–Australian regions. *Journal of*  
623 *Biogeography* **34**, 177–191.

- 624 Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by  
625 DNA polymorphism. *Genetics* **123**,585-595.
- 626 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary  
627 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and*  
628 *Evolution* **24**,1596-1599.
- 629 Thorbek P, Topping CJ, Sunderland KD (2002) Validation of a simple method for  
630 monitoring aerial activity of spiders. *Journal of Arachnology* **30**, 57-64.
- 631 Vahed K (1998) The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical  
632 studies. *Biological Reviews* **73**, 43–78.
- 633 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-  
634 CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in  
635 microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535–538.
- 636 Vandergast AG, Gillespie RG, Roderick GK (2004) Influence of volcanic activity on  
637 the population genetic structure of Hawaiian *Tetragnatha* spiders:  
638 Fragmentation, rapid population growth and the potential for accelerated  
639 evolution. *Molecular Ecology* **13**, 1729-1743.
- 640 Walter A, Bliss P, Moritz RFA (2005) The wasp spider *Argiope bruennichi*  
641 (Arachnida, Araneidae): Ballooning is not an obligate life history phase.  
642 *Journal of Arachnology* **33**, 516-522.
- 643 Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of  
644 population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- 645 Wolley C, Thomas CFG, Hutchings L, Goodacre S, Hewitt GM, Brooks SP (2007)  
646 A novel trap to capture ballooning spiders. *Journal of Arachnology* **35**, 307-  
647 312.
- 648 Zakharov EV, Hellmann (2007) Genetic differentiation across a latitudinal gradient  
649 in two co-occurring butterfly species: revealing population differences in a  
650 context of climate change. *Molecular Ecology* **17**, 189-208.

651           **Agradecimentos**

652

653           Nós gostaríamos de agradecer Cladinara Sarturi e André Schnorr pela  
654 assistência técnica. Pelo suporte em campo, gostaríamos de agradecer a Ângelo  
655 Gomes, Pedro Brum e Luiz Ernesto Costa-Schmidt. LCTS recebeu bolsa de  
656 mestrado do CNPq, e AMA e SLB receberam apoios financeiros do CNPq e da  
657 FAPERGS para a realização deste trabalho.

**Tabela 1** Heterozigosidades esperadas e observadas para cada loco de microsatélites.

	A1 <sup>†</sup>	B2 <sup>•</sup>	B4 <sup>‡</sup>	C1 <sup>•</sup>	D2 <sup>†</sup>	D4 <sup>†</sup>	F1 <sup>‡</sup>	F2 <sup>•</sup>	H2 <sup>‡</sup>	Média
H <sub>e</sub>	0,691	0,654	0,829	0,666	0,828	0,693	0,669	0,853	0,662	0,727
H <sub>o</sub>	0,290	0,576	0,715	0,649	0,538	0,734	0,588	0,437	0,696	0,580

<sup>†</sup>Fluorescência FAM, <sup>‡</sup>fluorescência NED, <sup>•</sup>fluorescência HEX.

**Tabela 2** Estatísticas básicas para cada população para os marcadores de microssatélites.

População	N	A	Alelos			Theta	G-W
			N únicos	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>		
CF	20	6,143(±1,952)	2	0,718(±0,094)	0,701(±0,186)	1,971	0,765
ENC	22	6,000(±1,826)	4	0,683(±0,095)	0,616(±0,169)	1,809	0,773
FL	20	6,429(±1,718)	5	0,737(±0,072)	0,709(±0,161)	2,078	0,768
LP	24	5,857(±1,676)	0	0,717(±0,105)	0,626(±0,198)	1,962	0,855
PB	15	5,429(±2,076)	4	0,594(±0,218)	0,573(±0,216)	1,573	0,771
RO	20	5,857(±1,952)	1	0,721(±0,094)	0,651(±0,153)	1,984	0,892
SS	20	5,571(±1,618)	3	0,693(±0,113)	0,620(±0,162)	1,850	0,756

N, número de indivíduos genotipados; A, riqueza alélica média (±desvio padrão); número total de alelos únicos; H<sub>e</sub>, heterozigidade esperada média (±desvio padrão); H<sub>o</sub>, heterozigidade observada média (±desvio padrão); Theta H médio e índice G-W médio.

**Tabela 3** Comparações par-a-par dos valores de estruturação com microssatélites. Valores de  $F_{ST}$  acima da diagonal e valores de  $R_{ST}$  abaixo da diagonal.

	PB	FL	LP	CF	ENC	RO	SS
PB		<b>9,6%</b>	<b>5,4%</b>	<b>8,3%</b>	<b>5,5%</b>	<b>4,1%</b>	<b>3,4%</b>
FL	<b>14,3%</b>		2,6%	<b>3,2%</b>	<b>4,7%</b>	1,7%	6,2%
LP	<b>13,4%</b>	3,0%		-1,1%	-0,1%	0,0%	2,6%
CF	<b>18,5%</b>	4,6%	2,6%		-0,1%	-0,8%	0,7%
ENC	9,1%	5,4%	1,4%	-0,5%		0,5%	2,1%
RO	7,7%	1,2%	0,8%	0,3%	-1,9%		0,0%
SS	<b>8,9%</b>	8,6%	5,0%	0,6%	-0,4%	-0,5%	

Em negrito as comparações com  $P < 0.00238$ .

**Tabela 4** Índices de diversidade das seqüências de CO1 por ponto amostral.

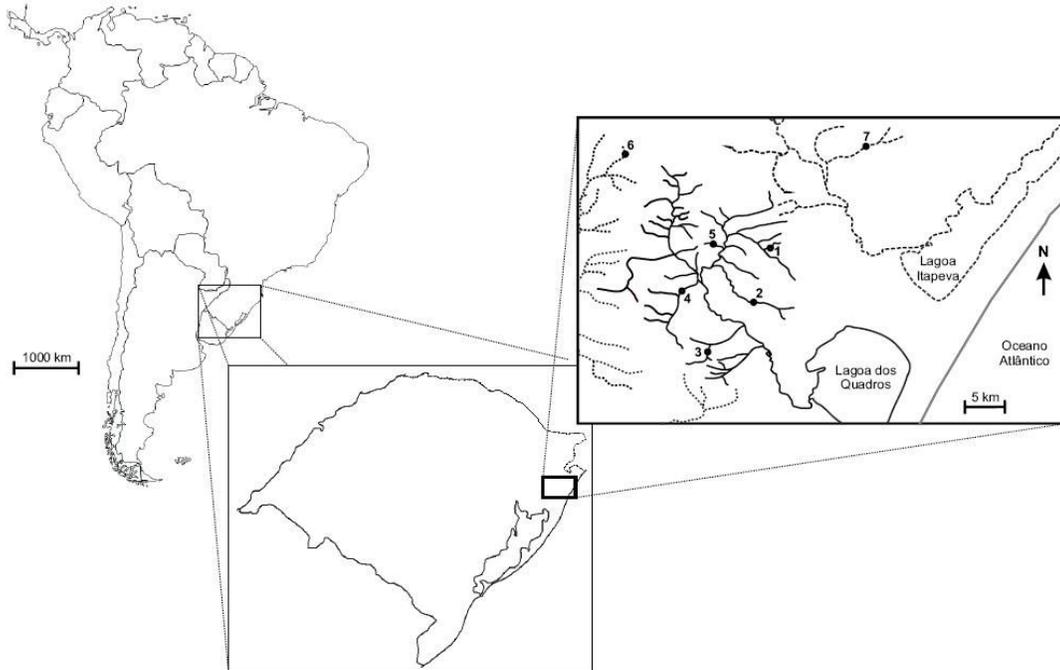
População	N	h	dh	n° de transições	n° de transversões	$\pi$
CF	14	11	0,967(±0,036)	16	11	1,692
ENC	13	7	0,872(±0,067)	14	6	1,806
FL	13	2	0,539(±0,060)	11	2	1,636
LP	14	4	0,495(±0,151)	18	4	1,327
PB	12	6	0,849(±0,074)	16	3	1,639
RO	14	9	0,912(±0,059)	18	8	2,265
SS	11	5	0,782(±0,093)	18	6	2,676

N, número de indivíduos; h, número de haplótipos, dh, diversidade haplotípica (±desvio padrão);  $\pi$ , diversidade nucleotídica em percentagem.

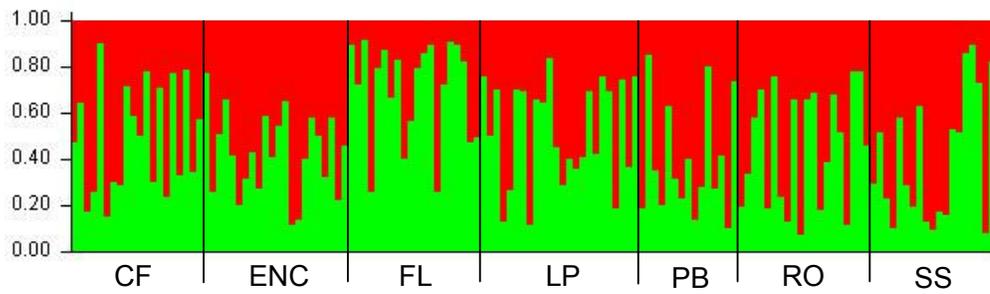
**Tabela 5** Comparações par-a-par dos valores de  $F_{ST}$  com os dados de CO1. Acima da diagonal, valores obtidos a partir das frequências dos haplótipos e abaixo da diagonal, valores obtidos a partir da distância entre os haplótipos.

	PB	FL	LP	CF	ENC	RO	SS
PB		<b>28.2%</b>	<b>25.9%</b>	2.2%	2.0%	4.5%	7.2%
FL	<b>30.3%</b>		13.0%	<b>21.9%</b>	17.8%	6.8%	18.3%
LP	<b>22.3%</b>	15.9%		<b>22.2%</b>	10.1%	<b>16.5%</b>	<b>31.1%</b>
CF	3.8%	<b>34.5%</b>	<b>24.1%</b>		3.8%	3.6%	9.3%
ENC	0.1%	<b>25.3%</b>	9.3%	-0.4%		2.8%	12.9%
RO	9.6%	0.4%	7.9%	12.5%	5.4%		1.0%
SS	7.3%	13.3%	26.1%	<b>19.2%</b>	14.8%	2.3%	

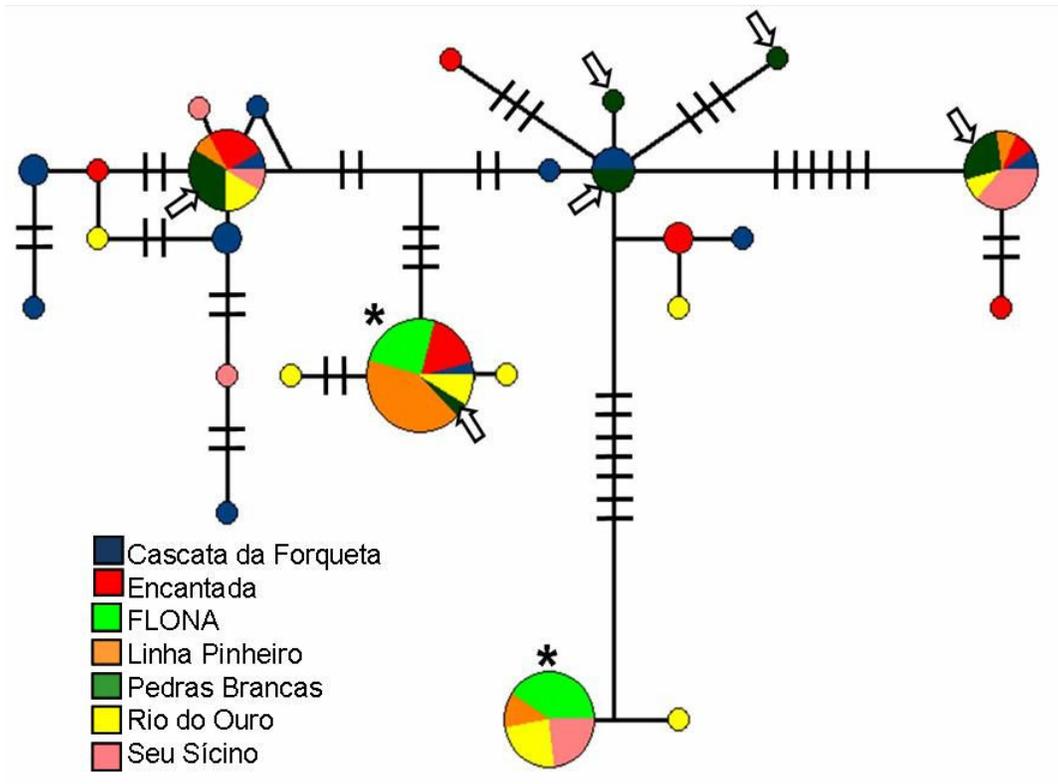
Em negrito as comparações com  $P < 0.00238$ .



**Figura 1** Mapa da localização dos pontos amostrais na micro-bacia do rio Maquiné e arredores, conforme descrito no Material e Métodos.



**Figura 2** Coeficiente de associação populacional dos indivíduos de *P. galianoae* amostrados calculado pelo programa STRUCTURE.



**Figura 3** Rede de haplótipos do gene CO1 para 91 indivíduos de *P.galiano*. O tamanho dos círculos indica a frequência dos haplótipos, as setas indicam indivíduos da população de Pedras Brancas e os asteriscos indicam indivíduos da população da FLONA, populações que não pertencem à micro-bacia do rio Maquiné.

## **Conclusão**

## Conclusão

Esse estudo contribui para o entendimento dos processos evolutivos e ecológicos que ocorreram e ocorrem com os indivíduos de *P. galianoae* e, como sempre em ciência, produz mais perguntas do que respostas.

O desenvolvimento de locos de microssatélites específicos para a espécie representa um grande salto no poder de exploração da diversidade molecular. Como já dito, este tipo de marcador possibilita a realização de uma série de análises ecológicas e evolutivas, e até hoje tem sido subutilizado em estudos com aranhas. Estes locos de STR desenvolvidos para *P. galianoae* ainda podem ser testados em outras espécies do gênero e da família, e se validados, colaborar na elaboração de estudos referentes às relações filogenéticas do grupo e possibilitar comparações diretas entre diferentes espécies em estudos ecológicos, populacionais e/ou filogeográficos.

Com respeito ao desenho amostral, a combinação do uso de pontos amostrais da micro-bacia do rio Maquiné, com pontos amostrais das micro-bacias adjacentes se mostrou um sucesso, dado o fato de que estas amostras “externas” ajudaram a elucidar os eventos ocorrentes nas populações foco do estudo. A identificação dos limites geográficos de uma população (uma micro-bacia), só foi possível a partir da verificação de que os pontos fora destes limites não faziam parte da mesma população. O emprego dos dois tipos de marcadores moleculares, STR e mtDNA, junto com as suas subseqüentes análises, deixou muito claro o padrão de estruturação das populações em questão.

Agora, nos cabe também levantar uma série de questões que não foram abordadas aqui. A identificação da existência de mais de uma população na região possibilita a formulação de hipóteses com respeito ao fluxo gênico, por exemplo. Programas computacionais possibilitam testar a existência e intensidade de fluxo gênico de forma assimétrica. Podemos também nos questionar como esse fluxo gênico ocorre. É interessante testar se as migrações ocorrem prioritariamente através dos rios de forma passiva ou em linhas aproximadamente retas, como é de se esperar em dispersão por balonismo (*ballooning*). Do mesmo modo, é importante testar se a cadeia de montanhas da região exerce algum tipo de barreira.

Aspectos relacionados à história demográfica desta população também devem ser abordados. O tamanho da população da micro-bacia do rio Maquiné continua uma incógnita para nós. Além disto, existem muitos indicativos de que esta população se mantém com um tamanho relativamente grande e estável por muito tempo (índices de neutralidade, distribuição dos *mismatches*, a rede de haplótipos, etc). Essa suposição pode ser melhor avaliada com o emprego de simulações que avaliem diferentes cenários históricos para a população da micro-bacia do rio Maquiné. Por exemplo, o padrão da rede de haplótipos (grande variação e compartilhamento) permanece inexplicado e pode ser utilizado para a formulação de diferentes cenários demográficos.

Esse trabalho, apesar das inúmeras questões que permaneceram em aberto, atingiu os seus principais objetivos. O uso de marcadores de microsatélite para as análises populacionais, segundo nosso conhecimento, foi realizado pela primeira vez para aranhas neste trabalho. Além disso, os trabalhos de genética de populações em aranhas neotropicais estão ainda começando a ser realizados. Assim, mais do que os seus resultados diretos, o nosso trabalho colabora para os estudos futuros com o seu pioneirismo na área.

## Referências Bibliográficas

- Aisenberg A, Vieira C, Costa FG (2007) Daring females, devoted males, and reversed sexual size dimorphism in the sand-dwelling spider *Allocosa brasiliensis* (Araneae, Lycosidae). *Behavior Ecology Sociobiology* **62** 29-35.
- Albo MJ, Costa-Schmidt LE, Costa FG (2009) To feed or to wrap? Female silk cues elicit male nuptial gift construction in a semiaquatic trechaleid spider. *Journal of Zoology*, doi:10.1111/j.1469-7998.2008.00539.x
- Arnedo MA, Coddington J, Agnarsson I, Gillespie RG (2004) From a comb to a tree: phylogenetic relationships of the comb-footed spiders (Araneae, Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**, 225–245.
- Austad SN, Thornhill R (1986) Female reproductive variation in a nuptial-feeding spider, *Pisaura mirabilis*. *Bulletin of the British Arachnological Society* **7**, 48-52.
- Becker FG, Irgang GV, Hasenack H, Villela FS, Verani N,F (2004) Land cover and conservation state of a region in the southern limit of the atlantic forest (river Maquiné basin, Rio Grande do Sul, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* **64**, 569-582.
- Bidegaray-Batista L, Macía-Hernández N, Oromí P, Arnedo MA (2007) Living on the edge: demographic and phylogeographical patterns in the woodlouse-hunter spider *Dysdera lancerotensis* Simon, 1907 on the eastern volcanic ridge of the Canary Islands. *Molecular Ecology* **16**, 3198-3214.
- Bilde T, Tuni C, Elsayed R, Pekár S, Toft S (2006) Death feigning in the face of sexual cannibalism. *Biological Letters* **2**,23–35.
- Bilde T, Tuni C, Elsayed R, Pekár S, Toft S (2007) Nuptial gifts of male spiders: sensory exploitation of the female's maternal care instinct or foraging motivation? *Animal Behavior* **73**, 267–273.
- Bond J (2004) Systematics of the Californian eucenizine spider genus *Apomastus* (Araneae: Mygalomorphae: Cyrtacheniidea): the relationships between molecular and morphology taxonomy. *Invertebrate Systematics* **18**, 361-376.
- Bond, J., Hedin, M., Ramirez, M. & Oppel, B. (2001) Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology* **10**, 899-910.
- Carico JE (2005) Descriptions of two new spider genera of Trechaleidae (Araneae, Lycosoidea) from South America. *Journal of Arachnology* **33**, 797-812.
- Chang J, Song D, Zhou K (2007) Incongruous nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in two sympatric lineages of wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae, Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 104-121.
- CIB – Conservation International do Brasil; Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas; Instituto de Pesquisas Ecológicas; Secretaria do Meio

- Ambiente do Estado de São Paulo & SEMAD/Instituto Estadual de Florestas, MG. (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade de Mata Atlântica e Campos Sulinos. *Ministério de Meio Ambiente/SBF*: 40p.
- Costa-Schmidt LE, Carico JE, Araújo AM (2008) Nuptial gifts and sexual behavior in two species of spider (Araneae, Trechaleidae, *Paratrechalea*). *Naturwissenschaften* **95**, 731–739.
- Croucher PJP, Oxford GS, Searle JB (2004) Mitochondrial differentiation, introgression and phylogeny of species in the *Tegenaria atrica* group (Araneae: Agelenidae). *Biological Journal Linnean Society* **81**, 79–89.
- Ellegren, H. (2004) Microsatellite: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**, 435-445.
- Evans TA, Goodisman MAD (2002) Nestmate relatedness and population genetic structure of the Australian social crab spider *Diaea ergandros* (Araneae: Thomisidae). *Molecular Ecology* **11**, 2307-2316.
- FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Rio Grande do Sul. (2000) Diretriz ambientais para o desenvolvimento dos municípios do Litoral Norte. *Cadernos de Planejamento e Gestão Ambiental* **1**: 95p,
- Gillespie RG, Croom HB, Palumbi SR (1994) Multiple origins of a spider radiation in Hawaii. *Proceedings of National Academy of Science* **91**, 2290-2294.
- Griswold CE, Coddington JA, Platnick NI, Forster RR (1999). Towards a phylogeny of entelegyne spiders (Araneae, araneomorphae, entelegynae). *Journal of Arachnology*. **27**, 53–63.
- Hedin M (2001) Molecular insights into Species Phylogeny, Biogeography, and Morphological Stasis in the Ancient Spider Genus *Hypochilus* (Araneae: Hypochilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 238-251.
- Maddison WP & Hedin M (2003) Phylogeny of *Habronattus* jumping spiders (Araneae: Salticidae), with preliminary consideration of genitalic and courtship evolution. *Systematic Entomology* **28**, 1-21.
- Meehan CJ, Olson EJ, Curry RL (2008) Exploitation of the Pseudomyrmex-Acacia mutualism by a predominantly vegetarian jumping spider (*Bagheera kiplingi*). *The 93<sup>rd</sup> ESA Annual Meeting*, disponível em [eco.confex.com/eco/2008/techprogram/P12401.HTM](http://eco.confex.com/eco/2008/techprogram/P12401.HTM).
- Moreno, J.A. (1961) Clima do Rio Grande do Sul. *Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul*, 42p.
- Nimer, E. (1990) Clima, In: *Geografia do Brasil: região sul*. IBGE: 151-187.
- Paquin P, Hedin M (2004) The power and perils of "molecular taxonomy": a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves. *Molecular Ecology* **13**, 3239-3255.
- Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond F<sub>ST</sub>: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 585-602.

- Platnick, N. I. 2009. The world spider catalog, version 9.5. American Museum of Natural History, disponible em [research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html](http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html)
- Roderick GK, Gillespie RG (1998). Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Molecular Ecology* **7**, 519-531.
- Sakaluk SK (2000) Sensory exploitation as an evolutionary origin to nuptial food gifts in insects. *Proceedings of the Royal Society B* **267**, 339–343.
- Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**, 63-69.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide for use and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Silva ELC, Lise AA, Buckup EH, Brescovit AD (2006) Taxonomy and new records in the Neotropical spider genus *Paratrechalea* (Araneae, Lycosoidea, Trechaleidae). *Biociências* **14**, 71-82.
- Spagna JC, Gillespie RG (2008) More data, fewer shifts: Molecular insights into the evolution of the spinning apparatus in non-orb-weaving spiders. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**, 347–368.
- Stålhandske P (2001) Nuptial gift in the spider *Pisaura mirabilis* maintained by sexual selection. *Behavior Ecology* **12**, 691–697.
- Starrett J, Hedin M (2007) Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographic complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology* **16**, 583-604.
- Stockman AK, Bond JE (2007) Delimiting cohesion species: Extreme population structuring and the role of ecological interchangeability. *Molecular Ecology* **16**, 3374-3392.
- Vahed K (2007) All that glitters is not gold: sensory bias, sexual conflict and nuptial feeding in insects and spiders. *Ethology* **113**, 105–127
- Vandergast AG, Gillespie RG, Roderick GK (2004) Influence of volcanic activity on the population genetic structure of Hawaiian *Tetragnatha* spiders: Fragmentation, rapid population growth and the potential for accelerated evolution. *Molecular Ecology* **13**, 1729-1743.
- Viera C, Costa FG, Ghione S, Benamú-Pino MA (2007). Progeny, development and phenology of the sub-social spider *Anelosimus studiosus* (Araneae, Theridiidae) in Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **42**, 145-153.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)