

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Camila Menezes Trindade Macrini

**“Estrutura genética populacional de *Aglaoctenus*
lagotis (Araneae, Lycosidae) em fragmentos de Mata Atlântica”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Camila Menezes T. Macrini</u> e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>Solferini</u>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vera Nisaka Solferini

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M247e Macrini, Camila Menezes Trindade, 1981-
 Estrutura genética populacional de *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae) em fragmentos de Mata Atlântica / Camila Menezes Trindade Macrini. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

 Orientador: Vera Nisaka Solferini.
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

 1. Genética de populações. 2. Aranha. 3. Fragmentação florestal. 4. Microsatélites (Genética). 5. DNA mitocondrial. I. Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Genetic population structure of *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae) in Brazilian Atlantic rainforest remnants

Palavras-chave em Inglês:

Population genetics

Spider

Forest fragmentation

Microsatellites (Genetics)

Mitochondrial DNA

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Louis Bernard Klaczko

André Victor Lucci Freitas

Evandro Marsola de Moraes

Karla Suemy Clemente Yotoko

Data da defesa: 10-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Vera Nisaka Solferini (Orientadora)



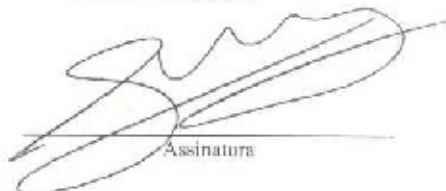
Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas



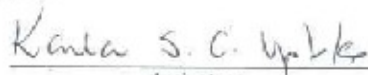
Assinatura

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes



Assinatura

Prof.^a. Dra. Karla Suemy Clemente Yotoko



Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Assinatura

Prof.^a. Dra. Karina Lucas da Silva Brandão



Assinatura

Prof. Dr. João Vasconcellos Neto



Assinatura

Prof.^a. Dra. Maura Helena Manfrin



Assinatura

Agradecimentos

À Vera, pela orientação, por ter me acolhido em seu laboratório e confiado em meu trabalho.

À Elen, minha querida colega, sempre muito sensata, pelas conversas, científicas ou não, e pelas inúmeras contribuições.

À Aluana, por sua uma honestidade inabalável, pela ajuda nas análises, nos manuscritos e importantíssimas sugestões para conclusão deste trabalho.

À Juliana José, pelo humor contagiante e comovente vontade de ajudar. Agradeço igualmente pelas frutíferas trocas de idéias e ajuda com as análises.

Aos técnicos do laboratório, Célia e Hebert, pelo auxílio. A Célia, em especial, pelo senso de organização afiado que facilita nossa rotina no laboratório, sem contar com os deliciosos cafés toda manhã.

Aos Professores Marcelo Gonzaga e Adalberto Santos, aqueles que primeiramente me apresentaram as aranhas e que me mostraram como elas são mais bonitas que assustadoras.

Às Professoras Maria Zucchi e Anete Pereira, e as colegas Prianda e Melissa, pela ajuda nos complexos protocolos da biblioteca de microsatélites.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto.

Aos membros da Banca Examinadora pelas valiosas contribuições.

Aos meus colegas de Laboratório de Diversidade Genética, pela convivência agradabilíssima que sempre guardarei no meu coração: Ricardo Gabriel, Renato, Maurício, Luiz Felipe, Caiame, João Vitonis, Renê, Patrícia, Rafael, João Del Giudice, Henrique, Bruno, Joice, Maína, Júlia, Sônia, Flávia.

Aos amigos da Vila: Natalie, Rafael, Leandro, Rafael, Rato, Olivia, Edu, Lorena, Julinda.

Às minhas professoras de Yoga, Thaís e Lorena, que fazem a minha vida mais leve e equilibrada.

À minha avó Lygia por me mostrar que se nada mais der certo: a elegância.

À minha avó Neusa por me tirar do castigo e me mostrar que as regras podem ser quebradas.

Às minhas tias, por serem tão autênticas e me mostrarem diferentes pontos de vista.

Aos meus primos, por me ensinarem a pular o muro.

À minha mãe, pelo eterno cuidado e companhia.

Ao meu pai, que me ensinou que a vida não deve ser vivida sem paixão.

À minha irmã, que nunca me deixa esquecer os detalhes.

Ao Kaiser, pela sua teimosia que se traduz em fidelidade e força.

Ao João Sereno, por fazer aflorar o que há de melhor em mim.

Por fim, agradeço às aranhas que perderam suas vidas para que esta tese fosse possível. Como compensação espero que este trabalho possa contribuir para preservação da Mata Atlântica, habitat de *Aglaoctenus lagotis* e outras inúmeras espécies.

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência."

Goethe
1749 - 1832

Sumário

Agradecimentos	IV
Sumário	VII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Figuras	X
Resumo	XI
Abstract	XII
1 Introdução	1
1.1 Mata Atlântica	1
1.2 Fragmentação do habitat	4
1.2.1 Aspectos gerais da fragmentação	4
1.2.2 Consequências genéticas da fragmentação	6
1.3 Ordem Araneae	7
1.3.1 Aranhas	7
1.3.2 Influência da estrutura do habitat na dinâmica populacional	8
1.3.3 Família Lycosidae	10
1.3.4 <i>Aglaoctenus lagotis</i>	10
1.4 Marcadores moleculares	12
1.4.1 Microsatélites	12
1.4.2 Gene mitocondrial COI	13
2 Objetivos	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Coletas	15
3.1.1 Área de estudo	15
3.2 Extração e quantificação de DNA	16
3.3 Construção de biblioteca enriquecida com microsatélites	17
3.3.1 Digestão do DNA para construção da biblioteca	18
3.3.2 Ligação aos adaptadores	18
3.3.3 Pré-amplificação	18
3.3.4 Seleção e Amplificação dos Fragmentos	19

3.3.5	Clonagem e transformação	20
3.3.6	Amplificação dos insertos clonados	21
3.3.7	Extração do DNA plasmidial	21
3.3.8	Sequenciamento dos insertos contendo microsatélites	22
3.3.9	Desenho de primers para amplificação de microsatélites	23
3.4	Amplificação dos loci de microsatélites	23
3.4.1	Condições utilizadas na reação de PCR	23
3.4.2	Eletroforese e genotipagem dos loci de microsatélites	24
3.5	Amplificação por PCR do gene mitocondrial COI	24
3.5.1	Condições utilizadas na reação de PCR	24
3.5.2	Purificação dos fragmentos de PCR de COI para sequenciamento	25
3.5.3	Sequenciamento do gene mitocondrial COI	25
3.5.4	Verificação da presença de <i>Numts</i> nas seqüências	26
3.6	Análise dos dados	27
3.6.1	Dados obtidos com marcadores de microsatélites	27
3.6.2	Dados obtidos com marcador mitocôndrial COI	28
4	Resultados	29
4.1	Biblioteca enriquecida com microsatélites	29
4.2	Análise dos dados obtidos com marcadores de microsatélites	31
4.3	Análises dos dados obtidos com sequenciamento do gene mitocondrial COI	37
4.4	Análises dos marcadores de microsatélites respeitando a divisão em grupos genéticos	37
4.5	Análises do gene COI considerando a divisão em grupos genéticos	39
5	Discussão	45
5.1	Diversidade Genética em <i>Aglaoctenus lagotis</i>	45
5.2	Grupos genéticos A e B de <i>Aglacotenus lagotis</i>	45
5.3	Estrutura intrapopulacional em <i>A. lagotis</i>	49
5.4	Conectividade entre populações em <i>A. lagotis</i>	50
6	Conclusão	53
	Bibliografia	XIII
	Anexos	XXIV
	Apêndice	XXV

Lista de Tabelas

3.1	Relação das datas de realização das coletas	15
3.2	Descrição dos pontos de coleta	17
3.3	Condições de PCR para amplificação dos locos de microsatélites	23
4.1	Primers desenhados para amplificação de marcadores de microsatélites de <i>A. lagotis</i>	30
4.2	Distribuição dos alelos de microsatélites nas populações estudadas	32
4.3	Estimativas de diversidade genética	33
4.4	Estimativas globais das estatísticas F'	34
4.5	Valores de F_{ST} par a par: Dados de microsatélites	34
4.6	Valores de F_{ST} par a par: Dados mitocondriais	37
4.7	Estimativas de diversidade genética com a presença dos Grupos A e B	40
4.8	Estatísticas F' considerando a presença dos Grupos A e B	41
4.9	Valores de F_{ST} par a par considerando a divisão em Grupos A e B: Dados de microsatélites	41
4.10	Alelos de microsatélites privados dos Grupos A e B	42
4.11	Resumo dos dados mitocondriais dos Grupos A e B de <i>A. lagotis</i>	42
4.12	Valores de F_{ST} par a par considerando a divisão em Grupos A e B: Dados mitocondriais	42
4.13	Teste de contingência permutacional da <i>Nested Clade Analysis</i> (NCA)	43
5.1	Diversidade em espécies da família Lycosidae estimadas com dados de microsatélites.	45
5.2	Trecho da sequência de aminoácidos da proteína COI com substituição de S por P no aminoácido 212	48
Anexo 1	Estatísticas F' da população total, sem os alelos Ala4 e Ala5	XXI
Anexo 2	Estimativa das frequências de alelos nulos por loco e população	XXI
Anexo 3	Teste exato de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weiberg	XXII
Anexo 4	Intervalo de confiança para F_{ST} das populações de <i>A. lagotis</i> . Dados de microsatélites	XXII
Anexo 5	Intervalo de confiança para F_{ST} das populações de <i>A. lagotis</i> corrigidos para alelos nulos. Dados de microsatélites	XXII
Anexo 6	Matriz de distância geográfica entre populações de <i>A. lagotis</i>	XXII
Anexo 7	Intervalo de confiança para F_{ST} das populações do Grupo A de <i>A. lagotis</i> . Dados de microsatélites	XXIII
Anexo 8	Intervalo de confiança para F_{ST} das populações do Grupo A de <i>A. lagotis</i> corrigido para alelos nulos. Dados de microsatélites	XXIII
Anexo 9	Valores de F_{IS} por loco nos Grupos A e B	XXIII

Anexo 10	Frequência haplotípica das populações de <i>A. lagotis</i>	XXIV
----------	--	------

Lista de Figuras

1.1	Extensão do Bioma Mata Atlântica	2
1.2	Remanescentes de Mata Atlântica no Estado de São Paulo	3
1.3	Mapa dos remanescentes de Mata Atlântica do município de Campinas	4
1.4	Localização da Serra do Japi no município de Jundiá	5
1.5	Imagem de <i>Aglaotenus lagotis</i> sobre sua teia.	11
3.1	Área de estudo	16
3.2	Representação gráfica do genoma mitocondrial de animais	25
4.1	Proporção dos microsátélites encontrados, classificados pelo tamanho da unidade de repetição	29
4.2	Proporção dos microsátélites encontrados, classificados pela composição	31
4.3	Número de alelos por loco e por população	32
4.4	Número de alelos totais, privados e raros	34
4.5	Correlação entre distâncias genéticas e geográficas	35
4.6	Valor de K ótimo segundo Evanno <i>et al.</i> (2005)	35
4.7	Teste de atribuição de grupos para populações de <i>Aglaotenus lagotis</i>	36
4.8	Localização dos indivíduos atribuídos aos Grupos A e B	36
4.9	Reconstrução filogenética dos haplótipos do gene COI de <i>A.lagotis</i>	38
4.10	Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI de <i>A.lagotis</i>	39
4.11	Rede de haplótipos e aninhamento hierárquico de <i>A. lagotis</i>	44
5.1	Análise comparativa dos dados obtidos com os marcadores nuclear e mitocondrial	46
5.2	Rede de haplótipos mostrando os Grupos A e B	47

Resumo

A Mata Atlântica é uma das mais importantes florestas tropicais do mundo e devido a sua grande riqueza de espécies e altas taxas de endemismo, é considerada um *hotspot* mundial para conservação. Apesar disso, o bioma tem sido intensamente devastado nos últimos 500 anos, com a maioria de seus remanescentes constituídos de fragmentos isolados. Um dos aspectos importantes da fragmentação do habitat é que esta pode afetar o padrão de variabilidade das populações. Esse processo depende de diversos fatores relacionados ao modo de vida das espécies, incluindo sua capacidade de dispersão, já que a habilidade dos organismos de se moverem entre as manchas de vegetação é determinante para a estrutura genética populacional. As aranhas (Ordem Araneae) constituem um bom modelo para o estudo de áreas fragmentadas, já que suas espécies possuem modos de dispersão e interações ecológicas bastante diversificados. O gênero sul-americano *Aglaoctenus* é representado por espécies com comportamento sub-social, que inclui cuidado parental, raro em aranhas. Este trabalho fez o estudo de genética populacional de *Aglaoctenus lagotis* em cinco fragmentos primários de Mata Atlântica (com variação de distâncias entre 2 e 47 quilômetros). Para tanto, foram utilizados dois marcadores moleculares: o primeiro de origem nuclear, microsátélites, e o segundo de origem mitocondrial, o gene COI. Os dados obtidos indicaram a presença de dois grupos genéticos (Grupos A e B) evidenciados por ambos marcadores, o que sugere a presença de duas espécies distintas. As altas taxas de endogamia encontradas nos dois grupos podem refletir fatores ecológicos que restringem sua dispersão e, além disso, o comportamento no qual as formas juvenis constroem suas telas próximas à tela materna. Apesar disso, as populações não estão completamente isoladas e apresentam estruturação moderada ($F_{ST}A=0,118$; $F_{ST}B=0,142$). A dispersão por via aérea (ou balonismo) permitiria a manutenção do fluxo gênico entre áreas fragmentadas, embora em escala insuficiente para evitar a alta taxa de cruzamento entre aparentados dentro das populações.

Abstract

The Brazilian Atlantic Rain Forest is one of the most important tropical forests in the world. Due to its great species richness and high endemic levels is considered a conservation hotspot. Despite its importance it has been intensively depleted in the last 500 years, with remnants composed of isolated fragments. Habitat fragmentation may change patterns of population variability. This process depends on species biology characteristics, including dispersion capacity, since the ability to move between patches define population genetic structure. Spiders are a suitable model for fragmented areas, because its species have different ways of dispersion and distincts ecological interactions. *Aglacotenus* is a South American genus that has subsocial behavior, not commonly found in spiders. In this work we studied the genetic population structure of *Aglacotenus lagotis* in five primary and disturbed Brazilian Atlantic Rain Forest remnants (apart from each other from 2 to 47 kilometers). The molecular markers used in this study were: nuclear microsatellites and mitochondrial COI gene. Our data showed the presence of two genetic groups (Group A and B) distinguished by both molecular markers, suggesting the existence of two different species. The high endogamic levels found in both groups may reflect ecological factors that restricts dispersion. Furthermore, spiderlings keep close to their mother's net, which contributes to population aggregation, despite competition and endogamy. Nevertheless, populations are not entirely isolated and show moderate levels of structure ($F_{ST}A=0,118$; $F_{ST}B= 0,142$). Thus, aerial dispersal (or ballooning) allows the maintenance of genetic flow between fragmentated areas, although in insufficient level to avoid endogamy within population.

1 Introdução

1.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos maiores biomas brasileiros, estendendo-se por quase todos os estados do litoral (do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul) e adentrando o continente nas regiões Sul e Sudeste até a Argentina e o Paraguai (Collins, 1990; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010). A área original do bioma era de 1.300.000 km² ou cerca de 15% do território nacional, englobando 17 estados brasileiros (Figura 1.1). (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010)

De acordo com a lei da Mata Atlântica (11.428/06) (IBGE, 1992; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010) (Figura 1.1) considera-se integrante do Bioma da Mata Atlântica: Florestas Ombrófilas Densas; Florestas Ombrófilas Mistas, também denominada Mata de Araucária; Florestas Ombrófilas Aberta; Florestas Estacionais Semidecíduas; Florestas Estacionais Decíduas; bem os manguezais; as vegetações de restinga, campos de altitude; brejos interioranos e encaves florestais do nordeste (Figura 1.1).

Em virtude desta alta cobertura e heterogeneidade das condições ambientais, a Mata Atlântica é um bioma reconhecido por sua grande diversidade. Estima-se que 1 a 8% das espécies do mundo estejam na Mata Atlântica (Myers *et al.*, 2000), com cerca de 20.000 espécies de plantas, mais de 1.400 de vertebrados terrestres; milhares de espécies de invertebrados (Laurance, 2009) e mais de 8000 espécies endêmicas (Tabarelli *et al.*, 2005).

Por todas essas características a Mata Atlântica é considerada um *hotspot*, isto é, uma área prioritária para conservação mundial (Brown Jr. & Brown, 1992; Myers *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2006; Colombo & Joly, 2010).

Apesar de sua importância, a Mata Atlântica tem sido intensamente devastada nos últimos 500 anos (Dean, 1995). Localizada na região mais populosa do Brasil, a Mata Atlântica sofreu séculos de exploração através do extrativismo, da agricultura, da caça,

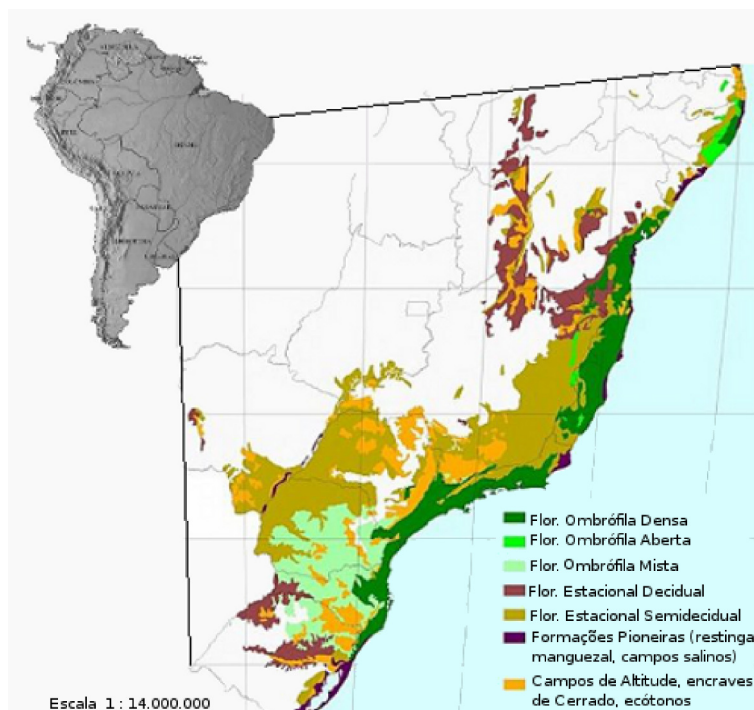


Figura 1.1: Extensão do Bioma Mata Atlântica conforme Lei Federal 11428/2006, Decreto 6660/2008. Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (2010).

da industrialização e da expansão urbana. Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica (2010) apenas 7% da área original deste bioma permanece preservado. Incluindo florestas secundárias e pequenos fragmentos (<100 ha), esta percentagem aumenta para 11.4% (Ribeiro *et al.*, 2009). Deste total 1% está em reservas e a maioria dos remanescentes se encontra extremamente fragmentado. (Laurance, 2009; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010)

A cobertura original da Mata Atlântica no Estado de São Paulo abrangia aproximadamente 68% de seu território (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010). Dados recentes apontam que o estado possui cerca de 15,78% de remanescentes de Mata Atlântica, sendo que 14,41% composto por florestas (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (2010); Figura 1.2). Segundo Rodrigues *et al.* (2008), São Paulo é o Estado com o maior número de espécies nativas da Mata Atlantica ameaçadas no Brasil (11% do total).

A região que compreende o município de Campinas e cidades adjacentes é atualmente

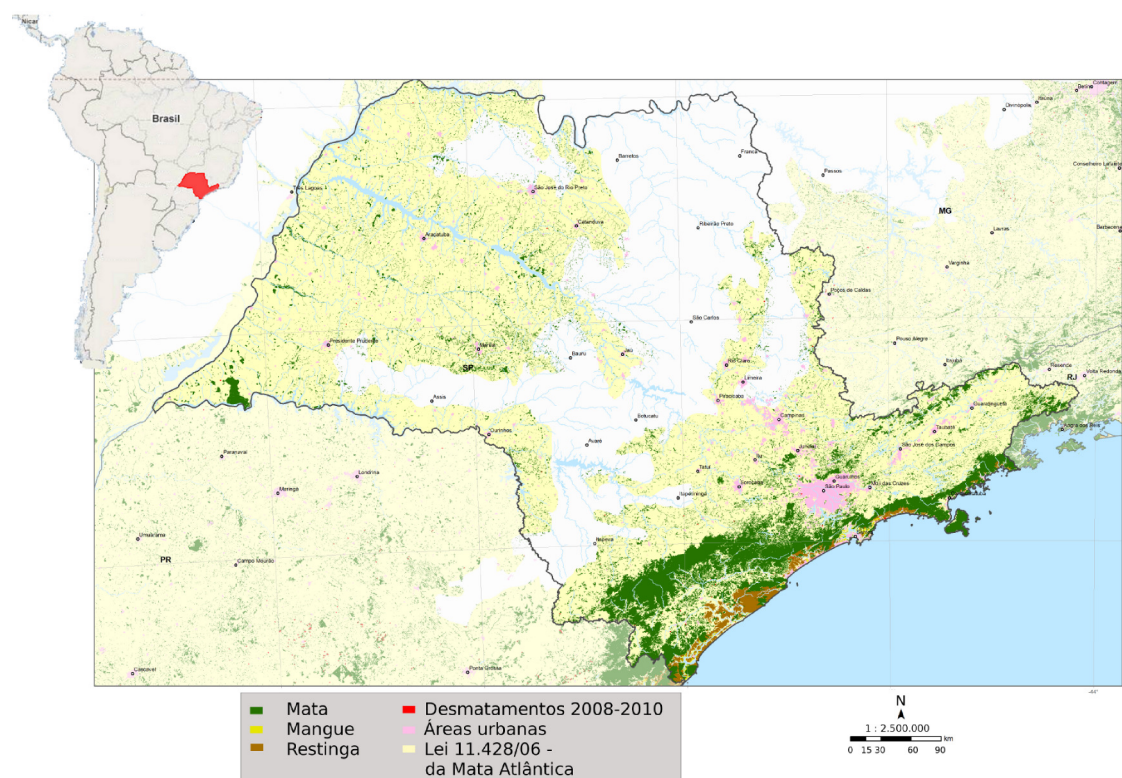


Figura 1.2: Remanescentes florestais de Mata Atlântica no Estado de São Paulo (Fonte: INPE/Fundação SOS Mata Atlântica, 2010).

uma das mais densamente povoadas de São Paulo e, assim como ocorreu na maior parte do Estado, sofreu uma drástica redução em sua vegetação original. Segundo Santin (1999), os remanescentes de Mata Atlântica em Campinas representam somente 2,42% da área municipal e encontram-se distribuídos em cerca de 197 fragmentos (Figura 1.3). A APA corresponde a aproximadamente 28% do município e, através de fotografias aéreas, foi observado que a maioria dos fragmentos mantém sua forma e tamanho atuais há pelo menos cinquenta anos. (Santin, 1999; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2010)

Por outro lado, na Serra do Japi, situada nos limites dos municípios de Jundiaí, Cabreúva e Cajamar, encontramos uma área de Mata Atlântica extensa e bem conservada, (Figura 1.4). A Serra do Japi é composta por aproximadamente 20.000 ha de vegetação heterogênea, sendo uma das últimas áreas de floresta contínuas do bioma no Estado

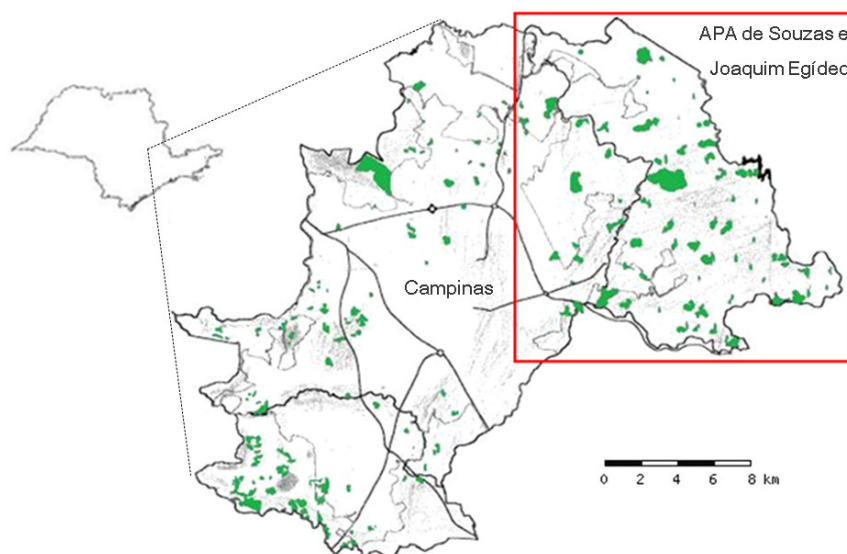


Figura 1.3: Mapa dos remanescentes florestais de Mata Atlântica do município de Campinas (adaptado de Santin 1999 (Santin, 1999). Em destaque: Área de Proteção Ambiental (APA) de Souza e Joaquim Egídio.

(Morellato, 1992; Joly, 1992). Entretanto, a área protegida pela Reserva abrange pouco mais de 2.000 ha, dos quais se estima que apenas 25% sejam de propriedade pública, o que dificulta a preservação dessa área. (Instituto Serra do Japi, 1998)

A fragmentação do habitat é um importante fator a ser considerado no estudo da biodiversidade das espécies. A Mata Atlântica com sua longa história de devastação é um valioso modelo para estudo dos efeitos da fragmentação (Laurent, 2009). Sendo assim, imprescindível a análise do impacto da fragmentação antrópica sobre as populações dos diversos grupos ali presentes, bem como das consequências dessa subdivisão a curto e longo prazo.

1.2 Fragmentação do habitat

1.2.1 Aspectos gerais da fragmentação

A fragmentação do habitat devido a uso humano da terra pode influenciar fortemente a biodiversidade e o ecossistema (Foley *et al.*, 2005; Lindenmayer & Fischer, 2006).

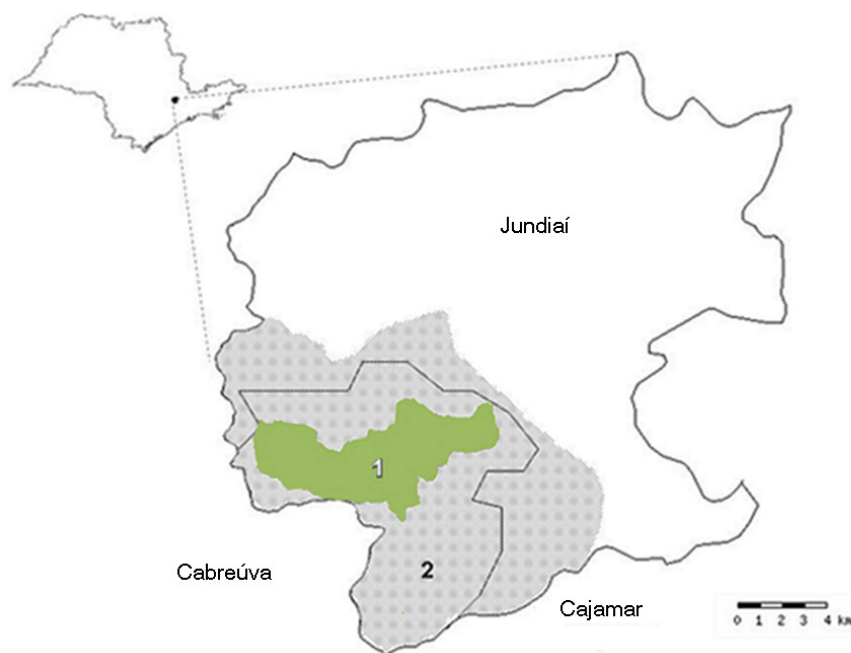


Figura 1.4: Localização da Serra do Japi (em verde) no município de Jundiaí (região hachurada). 1 = Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi; 2 = limite da área tombada [adaptado de Leite (2000)].

Nas florestas tropicais, como a Mata Atlântica, a fragmentação parece ter um efeito significativo na estrutura da comunidade e na dinâmica da população (Laurance & Bierregaard Jr, 1997; Laurance *et al.*, 2006; Groeneveld *et al.*, 2009; Pütz *et al.*, 2011).

Por exemplo, vem sendo observado que a fragmentação pode prejudicar ou mesmo interromper processos ecológicos chaves como a dispersão de semente (With & King, 1999; Melo, 2006), colonização (Collingham & Huntley, 2000), fluxo gênico (Hamrick, 2004; Haag *et al.*, 2010) e outros processos demográficos (Laurance & Bierregaard Jr, 1997; Laurance *et al.*, 2000; Lindenmayer & Fischer, 2006). Além disso, os altos níveis de endemismo da Mata Atlântica sugerem que muitas espécies se extinguíram e muitas se extinguirão devido à sua intensa fragmentação (Whitmore & Sayer, 1992; Brooks & Balmford, 1996; Metzger, 2009).

Apesar do amplo conhecimento atual sobre o impacto da fragmentação na dinâmica da biodiversidade, este ainda se mostra insuficiente. Isso ocorre devido à alta comple-

xidade do problema, o que torna difícil isolar as diferentes variáveis que operam no processo (Lindenmayer & Fischer, 2006). Essa complexidade é devido a uma série de fatores como: 1) as ricas interações ecológicas que uma determinada espécie está sujeita em um ecossistema tropical como a Mata Atlântica; 2) a diversidade da matriz que pode incluir uma série de tipos de habitat; 3) e os processos agindo nas bordas dos fragmentos de floresta (Pütz *et al.*, 2011).

1.2.2 Consequências genéticas da fragmentação

É amplamente aceito que a variabilidade genética cumpre um importante papel na persistência e adaptação das populações a mudanças ambientais (Lande & Shannon, 1996; Frankham *et al.*, 2002). A diminuição da variabilidade genética compromete a habilidades das espécies de evoluírem em resposta ao ambiente, e consequentemente aumenta o risco de extinção (Avice *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1996; Saccheri *et al.*, 1998; Reed & Frankham, 2003).

A perda de habitat pode erodir a diversidade genética das populações devido à diminuição do tamanho populacional e da conectividade interpopulacional (Johannesen *et al.*, 2007). O nível de diversidade genética em populações pequenas e isoladas é geralmente baixo, como uma consequência dos efeitos pronunciados da deriva gênica e endogamia (Gilpin & Soulé, 1986; Saccheri *et al.*, 1998). Já foi demonstrado, por exemplo, que a depressão endogamia afeta negativamente resistência a doenças (Spielman *et al.*, 2004), produção de esperma, habilidade acasalamento, fecundidade das fêmeas, sobrevivência juvenil, habilidade maternal, idade de maturidade sexual e sobrevivência dos adultos (Frankham, 2005).

Quando o tamanho e número das populações diminuem como consequência da fragmentação, os efeitos estocásticos se tornam de maior importância. Do ponto de vista metapopulacional o aumento de eventos estocásticos ambientais, demográficos e genéticos pode radicalmente reduzir o tempo da persistência das espécies (Hanski & Gilpin,

1991; Gomulkiewicz & Holt, 1995; Dara Newman, 1997).

A variabilidade genética e a estruturação das populações pode ser, por exemplo, favorecida, prejudicada ou não afetada pela fragmentação (van Dongen *et al.*, 1998; Schmitt & Seitz, 2002; Krauss, 1994; Dixo *et al.*, 2009; Filgueiras *et al.*, 2011). Esses resultados conflitantes podem ser explicados pelas diferenças na habilidade do organismo de se mover entre as porções de vegetação original, o que é influenciado pelas propriedades específicas da matriz, pela distância entre os fragmentos e pela capacidade de dispersão da espécie (Fahrig, 2003; Pütz *et al.*, 2011). Assim, é imprescindível que organismos com diferentes capacidades de dispersão sejam estudados em um mesmo habitat possibilitando uma comparação entre os resultados e um maior entendimento sobre os efeitos da fragmentação do habitat sobre a variabilidade genética das espécies.

As aranhas (Ordem Araneae) constituem um bom modelo para o estudo de áreas fragmentadas, já que suas espécies possuem modos de dispersão e interações ecológicas bastante diferentes (Marshall *et al.*, 2006; Rego *et al.*, 2007; Prieto-Benítez & Méndez, 2011). Além disso, um número substancial de espécies de aranhas pode estar em vias de extinção como resultado da atividade humana, mais especificamente, a destruição de seus habitats naturais (Hafernik, 1992).

1.3 Ordem Araneae

1.3.1 Aranhas

Dentre os Arachnida, a ordem Araneae é a segunda mais diversa, com 42.473 espécies descritas distribuídas em 110 famílias (Platnick, 2011). As aranhas compreendem uma porção bastante significativa de todos os artrópodes terrestres e são amplamente distribuídas por todo o planeta, exceto na Antártida.(Platnick, 1995)

A ordem está dividida em três infraordens: Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae. Destas apenas Mesothelae não tem representantes neotropicais, ocorrendo

exclusivamente na região asiática (Platnick, 1995). As aranhas da infraordem Mygalomorphae (popularmente conhecidas como caranguejeiras ou aranhas-peludas) são facilmente diagnosticadas pelas quelíceras dispostas paralelamente e pela presença de apenas quatro fiandeiras (Platnick, 1995). As Araneomorphae estão representadas por quase 90% das aranhas conhecidas e são caracterizadas pelas quelíceras verticais, opostas uma em relação à outra, e por apresentar geralmente seis fiandeiras. (Foelix, 1996)

O Brasil é uma das áreas do mundo com maior diversidade de aranhas, sendo que das 110 famílias de aranhas, 67 possuem registros para o país (Brescovit *et al.*, 2004). Atualmente, as áreas mais estudadas no Brasil são a Floresta Amazônica (Brescovit, 1999; Borges & Brescovit, 1996; Hofer, 1990) e a Mata Atlântica litorânea da Região Sudeste (Brescovit, 1999). Apesar disto, estima-se que sejam conhecidas apenas 30% das aranhas brasileiras, sendo as regiões sul e sudeste as mais bem representadas em coleções científicas. (Brescovit, 1999)

1.3.2 Influência da estrutura do habitat na dinâmica populacional de aranhas

A distribuição das aranhas em uma determinada região está fortemente ligada à sensibilidade da espécie a fatores abióticos intrínsecos do ambiente, como temperatura, umidade, vento e intensidade luminosa, ficando algumas aranhas restritas a habitats com menor variação de condições climáticas. (Foelix, 1996)

As aranhas apresentam uma grande variedade de hábitos de vida, incluindo táticas de construção de teias e obtenção de alimento, o que possibilita a ocupação dos mais variados tipos de habitat e a ocorrência de várias espécies no mesmo local (Turnbull, 1973). Dentro das faixas de tolerância às condições físicas, a distribuição espacial também é influenciada por vários fatores bióticos, como suprimento de presas, abundância de competidores, predadores ou parasitas e, principalmente, pela vegetação característica. (Souza, 2007)

Tendo em vista a grande influência do habitat sobre a distribuição das espécies, a diminuição da Mata Atlântica a menos de 10% da área original pode ser um fator significativo nas dinâmicas populacionais (Scarano, 2002; Schwarcz *et al.*, 2010). A habilidade das aranhas de se dispersar pode delimitar sua sobrevivência nos diferentes fragmentos, uma vez que os níveis de fluxo gênico entre subpopulações são importantes para o aumento da persistência das mesmas (Reed *et al.*, 2007; Watling & Donnelly, 2006; Johannesen *et al.*, 2007). Quando as condições locais se tornam desfavoráveis, as aranhas podem migrar para outras áreas por diversos mecanismos, que variam desde o movimento cursorial até a dispersão por balonismo (Souza, 2007).

O balonismo é o tipo de dispersão mais frequente nos primeiros estágios de vida, no qual as aranhas tecem pequenos emaranhados de seda com o abdômen voltado para cima e se lançam nas correntes de ar, podendo ocasionalmente alcançar centenas ou até mesmo milhares de quilômetros de distância (Decae, 1987). Mesmo alcançando locais desfavoráveis na maioria das vezes, este modo de dispersão é rápido e garante a expansão da distribuição das aranhas pela colonização de novas áreas e, conseqüentemente, a manutenção das populações (Samu *et al.*, 1999).

Um modo de dispersão intermediário entre o balonismo e a locomoção pelo substrato (movimento cursorial) é definido como *rigging*. Neste, as aranhas sobem nas partes mais altas da vegetação e liberam um fio de seda que alcança outro ponto através do movimento do ar (Gonzaga, 2007). Este tipo de dispersão tem um alcance mais curto que o balonismo, mas apresenta um risco de mortalidade menor e com possibilidade de direcionamento do movimento (Samu *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos ressaltam a dificuldade em se obter uma medida direta da capacidade de dispersão das aranhas. A ocorrência de balonismo, por exemplo, só foi documentada para poucas espécies (Schneider *et al.*, 2001). Entretanto, é possível obter estimativas indiretas da taxa de migração entre populações por meio da análise genética dos indivíduos, como tem sido feito recentemente para várias espécies de aranhas

(Ramirez & Fandino, 1996; Ramirez & Haakonsen, 1999; Colgan *et al.*, 2002; Vander-gast *et al.*, 2004; Johannesen *et al.*, 2005; Bidegaray-Batista *et al.*, 2007; Bonte, 2009; Lubin *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2011). Assim, a partir das análises de dados genéticos moleculares pode-se inferir a dinâmica populacional de aranhas em um determinado habitat.

1.3.3 Família Lycosidae

A família Lycosidade é representada por 2382 espécies e 118 gêneros (Platinick, 2011) que ocorrem em todo o mundo, sendo constituída por espécies errantes que caçam ativamente ou por emboscada (Ford, 1978; Foelix, 1982). As espécies da família Lycosidae são conhecidas como "aranhas-lobo" em referência à sua estratégia de forrageamento (Sordi, 1996).

Durante o período reprodutivo, as aranhas Lycosidae apresentam cuidado parental, o que lhes confere a denominação de subsociais (Shear *et al.*, 1989). As fêmeas desta família constroem a ooteca e a mantêm preso ao corpo; Na época do nascimento, os juvenis escalam o corpo da mãe e permanecem sobre ele por cerca de uma semana (Sordi, 1996).

As aranhas Lycosidade apresentam dois comportamentos associados ao uso da teia: o primeiro envolve a utilização da seda para construção de ootecas, balonismo e ocasionalmente a construção de refúgios temporários, como nos gêneros *Pardosa*, *Lycosa* (Sordi, 1996). O segundo está associado à permanência prolongada nos refúgios, como no gênero *Aglaoctenus* (Sordi, 1996; Santos & Brescovit, 2001).

1.3.4 *Aglaoctenus lagotis*

O gênero *Aglaoctenus* é representado por aranhas sul-americanas que constroem teias, constituindo uma exceção dentro da família Lycosidae, composta preponderantemente por aranhas errantes (Sordi, 1996; Santos & Brescovit, 2001). A teia dessas

aranhas, bastante peculiar, é constituída por uma lâmina de seda e um tubo que se afunila até adentrar um abrigo em meio à vegetação (Sordi, 1996)(Figura 1.5). A escolha dos locais para construção de teias considera a estrutura da vegetação, o microclima, e a disponibilidade de presas (Izidoro & Del-Claro, 2005).

Aglaoctenus lagotis (Holmberg, 1876), é uma espécie de Lycosidae que ocorre na América do Sul, desde a Colômbia até a Argentina em fragmentos de Mata Atlântica (Santos & Brescovit, 2001). Essa espécie prefere ambientes úmidos e com baixa exposição ao sol (Rubio & Torres, 2003). A dispersão de *A. lagotis* parece acontecer de forma restrita, uma vez que as formas juvenis constroem suas teias próximas à teia materna (Santos & Brescovit, 2001). Um fator importante para distribuição dessa espécie parece ser a abundância de alimento: Em locais com recursos abundantes, as teias de *A. lagotis* possuem distribuição agregada, que se torna mais espaçada em ambientes de alimento mais escasso (Pellegrino *et al.*, 2005).



Figura 1.5: Imagem de *Aglaoctenus lagotis* sobre sua teia.

1.4 Marcadores moleculares no estudo de genética populacional

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar os denominados "marcadores moleculares", que são todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA; constituindo importantes ferramentas em estudos populacionais, pois podem fornecer informações importantes sobre a composição das populações, como variabilidade genética e grau de parentesco entre indivíduos, e sobre a estrutura genética dessas populações, representada pelo grau de diferenciação genética entre elas (Avisé, 2004; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

1.4.1 Microsatélites

Microsatélites, ou sequências simples repetidas (SSR), são compostos por sequências de um a seis pares de base repetidos em tandem, abundantes e dispersos por todo o genoma dos organismos eucarióticos. Como marcadores codominantes, os locos específicos são usados frequentemente para o fingerprinting de DNA, teste de paternidade, para a construção de mapas de ligação e os estudos genéticos da população (Hayden & Sharp, 2001).

Os marcadores moleculares SSR apresentam características altamente desejáveis para o estudo de diversidade e estrutura genéticas de populações: 1) são marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel; 2) estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos; 3) são altamente multialélicos (McCouch *et al.*, 1997); 4) são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA; 5) e, uma vez desenvolvidos, os primers que amplificam tais regiões do genoma, podem ser facilmente compartilhados entre laboratórios (Suganuma & Ciampi, 2001). Todas essas características tornam os

microsatélites marcadores eficientes nas análises de diversidade genética de populações. (Powell *et al.*, 1995; Rajora *et al.*, 2000)

1.4.2 Gene mitocondrial COI

Outro sistema de marcadores moleculares muito utilizado para o estudo de genética de populações é o DNA mitocondrial (mtDNA). Desde o início de sua aplicação foi utilizado para examinar questões de genética e evolução como estrutura populacional, padrões de hibridização, e relações evolutivas em uma variedade de *taxons* de animais (Gerber *et al.*, 2001)

Vários atributos deste marcador foram responsáveis pela permanência de sua popularidade nos estudos de evolução, como a ausência de mecanismos de reparo eficientes que permite uma rápida evolução das sequências de mtDNA, o que as torna viáveis para análises de estrutura populacional (Brown *et al.*, 1979). Além disso, a herança materna, a natureza não recombinante e os altos níveis de polimorfismo fazem do mtDNA um marcador extremamente útil no estudo de processos como fluxo gênico, efeito do fundador, gargalos genéticos e, mais recentemente, inferências filogeográficas (Avice, 2004).

Regiões específicas do DNAm_t evoluem a diferentes taxas, podendo ser utilizadas como ferramentas para o estudo de evolução em hierarquias taxonômicas distintas. O gene mitocondrial COI, por exemplo, é usado extensamente para inventário de espécies baseado em sequência de DNA ou DNA barcoding, (Erpenbeck *et al.*, 2005; Seifert *et al.*, 2007; Alessandrini *et al.*, 2008; Rock *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Gall, 2010; Jung & Lee, 2011) mas, também tem se mostrado útil para investigação filogeográfica e populacional de uma única espécie (Yu *et al.*, 2009; Solorzano *et al.*, 2009; Pavesi *et al.*, 2011).

2 Objetivos

Este trabalho propôs o estudo da diversidade genética e estrutura populacional de *Aglaotenus lagotis* em áreas da Mata Atlântica do Estado de São Paulo utilizando marcadores de microsatélites e de mtDNA com o objetivo de investigar a dinâmica populacional desta espécie e a conectividade das populações de *A. lagotis* entre remanescentes florestais.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver primers específicos para *A. lagotis* para amplificação de locos de microsatélites.
- Estimar a variabilidade e estrutura genéticas das populações de *A. lagotis*;
- Inferir os processos responsáveis pela atual distribuição da variabilidade e conectividade entre os fragmentos na região estudada, comparando os dois tipos de marcadores utilizados;

3 Materiais e Métodos

3.1 Coletas

As coletas foram realizadas entre março de 2007 e março de 2008, concentrando-se entre janeiro e maio, meses tipicamente chuvosos (59 a 243,3 mm/mês), em que há abundância considerável de aranhas. Todos os indivíduos foram coletados manualmente e levados vivos para o laboratório, após a identificação, as aranhas coletadas tiveram seu DNA imediatamente extraído ou ficaram armazenadas em nitrogênio líquido até sua utilização. A tabela 3.1 mostra as datas de coleta para cada local amostrado.

Tabela 3.1: Relação das datas de realização das coletas de amostras de material biológico.

Local	Período de coleta
Ribeirão Cachoeira	13/01/2007 a 05/09/2007
St. Antônio das Mangueiras	10/01/2008 a 13/03/2008
Valinhos	06/03/2008 a 09/05/2008
Japi 1	31/01/2008 a 02/04/2008
Japi 2	01/05/2007 a 18/05/2007

3.1.1 Área de estudo

Foram estudadas cinco populações de *Aglaoctenus lagotis* nos seguintes fragmentos (Figura 3.1): 1) Fazenda Santo Antônio das Mangueiras (ANT), localizada na Área de Proteção Ambiental (APA) de Sousas e Joaquim Egídio, Campinas, SP; 2) Ribeirão Cachoeira (RC), localizada na Área de Proteção Ambiental (APA) de Sousas e Joaquim Egídio, Campinas, SP; 3) Observatório Abrahão de Moraes (VAL), Valinhos, SP; 4 e 5) Serra do Japi (Japi 1 e Japi 2), Jundiaí, SP.

Na tabela 3.2 encontram-se a localização e o tamanho aproximado de cada ponto de coleta, bem como o número de indivíduos (N) analisados em cada área.

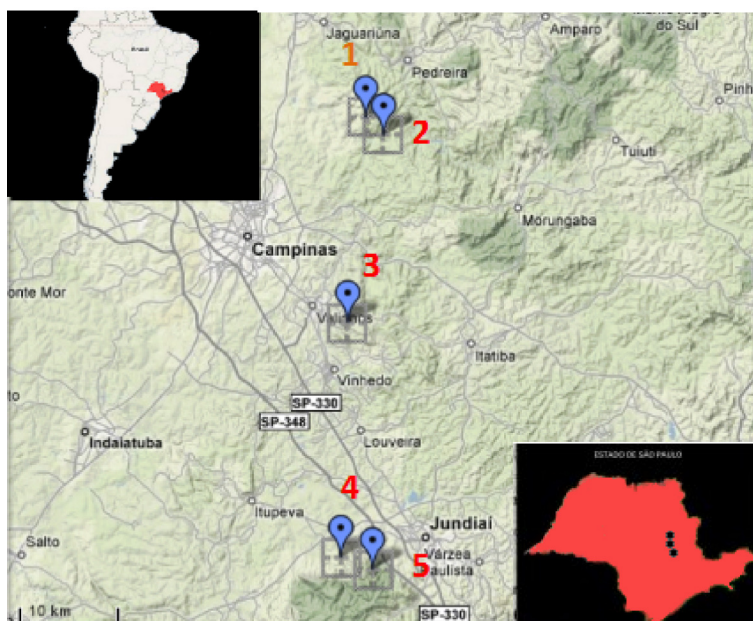


Figura 3.1: Área de estudo. 1) Santo Antônio dos Mangueiras (APA de Souza e Joaquim Egídeo, Campinas, SP); 2) Ribeirão Cachoeira (APA de Souza e Joaquim Egídeo, Campinas, SP) 3) Observatório Abrahão de Moraes, (Valinhos, SP); 4) Serra do Japi 2 (Jundiaí, SP) e 5) Serra do Japi 1 (Jundiaí, SP).

3.2 Extração e quantificação de DNA

Foram utilizados para extração de DNA apenas o tecido do cefalotórax e das pernas. A partir da sugestão do fabricante do kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), adaptou-se um protocolo que consistiu nas seguintes etapas: 1) maceração de até 2 g de tecido; 2) adição de 600 μL de solução de lise (*Cell Lysin Solution*); 3) aquecimento do macerado a 65°C durante a noite; 4) descanso de 4 minutos à temperatura ambiente; 5) adição de 200 μL de solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*); 6) homogeneização das amostras ao vórtex por 20 segundos; 7) resfriamento em gelo por 5 minutos; 8) centrifugação por 6 minutos a 10.000 g e 25°C; 9) transferência do sobrenadante para um novo microtubo com 600 μL de álcool isopropílico absoluto; 10) centrifugação das amostras por 2 minutos a 10.000 g e 25°C; 11) descarte do sobrenadante; 12) adição de 600 μL de etanol 70% em cada microtubo; 13) centrifugação das amostras por 2 minutos a 10.000 g e 25°C com posterior descarte

Tabela 3.2: Descrição dos pontos de coleta: Município, município de localização dos fragmentos; Tamanho, tamanho em hectares dos fragmentos estudados; Coordenadas, coordenadas de cada fragmento obtidas com base no sistema de posicionamento global (GPS); N, número de indivíduos utilizados na análise.

População	Município	Tamanho (ha)	Coordenadas	N
ANT	Campinas	50	22°48'56"S, 46°56'31"O	27
RC	Campinas	245	22°49'56"S, 46°55'40"O	22
VAL	Valinhos	100	23°00'35"S, 46°57'43"O	29
JAPI1	Jundiaí	20.000	23°14'13"S, 46°56'18"O	34
JAPI2	Jundiaí	20.000	23°13'37"S, 46°58'06"O	19

dos sobrenadantes; 14) secagem dos microtubos por 15 minutos; 15) adição de 50 μ L de água ultrapura; 16) agitação manual dos microtubos para solubilizar o DNA; 17) repouso por 10 minutos; 18) congelamento para estocagem.

Para avaliar sua qualidade e concentração, o DNA extraído foi comparado com o DNA-padrão *LowDNA Mass* (Invitrogen) em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) utilizando tampão TBE 1X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) contendo brometo de etídeo, em voltagem de 100 V por 40 minutos. O DNA das amostras foi diluído para uma concentração padrão de 10ng/ μ L .

3.3 Construção de biblioteca enriquecida com microsátélites

Para a caracterização da variabilidade genética de *Aglacotenus lagotis* foi construída uma biblioteca genômica para a seleção dos fragmentos contendo marcadores moleculares microssatélites (SSR). O protocolo utilizado para a construção da biblioteca foi descrito por Billotte *et al.* (1999). As etapas da construção da biblioteca e respectivas modificações do protocolo estão descritas abaixo.

3.3.1 Digestão do DNA para construção da biblioteca

O DNA foi digerido para gerar fragmentos de tamanhos adequados. Um total de 6,5 μ g de DNA foi digerido utilizando 0,5 U/ μ L da enzima Rsa I (Invitrogen) a 37°C por 15 horas. A verificação da digestão foi feita em gel de agarose. As condições de eletroforese utilizadas aqui e ao longo de todo protocolo de construção da biblioteca foram: gel de agarose 1,0% (p/v), tampão TBE 1X, contendo brometo de etídeo, e voltagem de 70 V por 1 hora e 30 minutos.

3.3.2 Ligação aos adaptadores

O produto da digestão foi ligado aos adaptadores Rsa21 (5' CTCTTGCTTACGCGTG-GACTA 3') e Rsa25 (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'), a fim de garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação comum e conhecida. A reação de ligação foi realizada a 20°C por 2 h em termociclador utilizando-se 20% (v/v) do produto da digestão; 0,4 μ M de Rsa21; 0,4 μ M de Rsa25; 8% (v/v) de enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen); e 20% (v/v) de tampão (Invitrogen)

3.3.3 Pré-amplificação

A etapa de pré-amplificação foi feita visando aumentar a quantidade de fragmentos que foram ligados aos adaptadores. Na reação utilizou-se 3,0 μ L de fragmentos ligados aos adaptadores e 47 μ L de reação de PCR (0,2 mM de dNTPs ; 0,4 μ M de Rsa21; 5 U de Taq DNA polimerase [Fermentas Life Sciences]; 1,5 mM de MgCl₂ e 10% (v/v) de tampão [Fermentas Life Sciences]). A ciclagem utilizada foi: 1) desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos; 2) 20 ciclos: de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e 3) extensão final a 72°C por 8 minutos.

Em seguida, o produto de PCR foi purificado utilizando o Kit QIAquick (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

3.3.4 Seleção e Amplificação dos Fragmentos

Após a purificação, foi realizada uma etapa de seleção de fragmentos de DNA contendo microssatélites. A seleção foi obtida através de beads magnéticas (Promega) e de sondas biotiniladas contendo repetições em tandem de dinucleotídeos CT (5' biotin-[CT]₈ 3') e GT (5'biotin-[GT]₈ 3').

A solução de beads foi lavada quatro vezes com 300 μ L de tampão SSC 0,5 X (diluição do tampão SSC 20X [Cloreto de Sódio 3 M e Citrato de Sódio 0,3 M pH 7,0]). Paralelamente, o DNA foi diluído 5X e incubado a 95°C por 15 minutos. Depois, a amostra recebeu 13 μ L de SSC 20x e 150 μ M de cada oligo biotinilado, foi deixada em temperatura ambiente e agitada suavemente em intervalos de um 1 minuto durante 20 minutos.

Em seguida, adicionou-se os beads à solução de DNA e oligonucleotídeos, e incubou-se a mistura por 10 minutos a temperatura ambiente, sempre agitando gentilmente. Depois a amostra foi colocada em uma estante magnética, para que os fragmentos de DNA ligados as sondas biotiniladas fossem atraídos pelo campo magnético e selecionados. Os beads foram lavados quatro vezes em SSC 0,1X e finalmente ressuspensos em 250 μ L de água ultrapura.

Dos fragmentos selecionados, 20 μ L foram utilizados para amplificação por PCR num volume total de 100 μ L de reação (0,2 mM de dNTPs, 0,4 μ M do primer Rsa21, 3 U de Taq DNA polimerase [Fermentas Life Sciences], 1,5 mM de MgCl₂ e 10% (v/v) de tampão [Fermentas Life Sciences]).

A ciclagem utilizada foi: 1) desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto; 2) 25 ciclos de amplificação de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e 3) extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à verificação em eletroforese de gel de agarose.

3.3.5 Clonagem e transformação

Os fragmentos amplificados foram ligados a um vetor de clonagem pGem -T-Vector (kit pGem-T Vector System I, Promega). A ligação foi feita a 4°C por 15 horas, com 50 ng de plasmídeo, 3 U de ligase (todos componentes fornecidos pelo kit) e 8 μ L dos fragmentos, num volume final de 10 μ L.

Cerca de 100 μ L de células competentes XL1-Blue (*Escherichia coli*, Stratagene) foram adicionadas a 4 μ L de fragmentos ligados ao vetor. Para a etapa de transformação as células foram deixadas sobre gelo durante 20 minutos, mergulhadas em banho-maria a 42°C por dois minutos, e recolocadas no gelo por mais 5 minutos. Após o choque térmico, em câmara-fluxo, adicionaram-se 450 μ L de meio LB (0,1% [p/v] de triptona; 0,05% [p/v] de extrato de levedura; 0,1% [p/v] de NaCl; pH 7,0) autoclavado e pré-aquecido a 37°C. Em seguida, as células foram encubadas em estufa a 37°C por 50 minutos.

Após a incubação, 200 μ L das células transformadas foram aliquotados sobre placa de Petri contendo meio LB sólido (0,1% [p/v] de triptona, 0,05% [p/v] de extrato de levedura, 0,1 % [p/v] de NaCl e 0,15% [p/v] de Select Agar, em pH 7,0) contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Também aliquotou-se na placa de Petri 60 μ L de IPTG (20% [p/v]) e 60 μ L de X-GAL (2% [p/v]). Em seguida, as placas de Petri foram deixadas em estufa a 37°C por 15 horas.

Após a incubação, as colônias de coloração branca (96 unidades) foram repicadas em poços de microplaca do tipo ELISA contendo 140 μ L de meio 2YT-HMFM (1,6% [p/v] de triptona, 1% [p/v] de extrato de levedura, 0,5% [p/v] de NaCl, 0,0076% [p/v] de MgSO₄ [7H₂O], 0,045% [p/v] de Citrato de Sódio, 0,09% [p/v] de (NH₄)₂SO₄, 4,4% [p/v] de glicerol, 0,18% [p/v] de KH₂PO₄ e 0,47% [p/v] de K₂HPO₄) acrescido de 100 μ g/ml de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 15 horas, fechadas com adesivo selador (AB-Gene) e transferidas para freezer -20°C.

3.3.6 Amplificação dos insertos clonados

Para verificar o sucesso da etapa anterior, 1 μL das células clonadas em suspensão foram adicionadas a 24 μL de reação de PCR (0,4 mM de dNTPs; 0,25 μM de Rsa21; 1 U de Taq DNA polimerase [Fermentas Life Sciences]; 0,4 mM de MgCl_2 ; e 10% (v/v) de tampão [Fermentas Life Sciences]).

A ciclagem utilizada foi: 1) desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos; 2) 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1,5 minuto; e 3) extensão final a 72°C por 8 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e os clones transformados foram mantidos a -80 °C até o início da etapa seguinte.

3.3.7 Extração do DNA plasmidial

Nesta etapa, 2 μl das colônias clonadas crescidas em meio LB foram transferidas para uma placa de poços fundo (AB-GENE), onde foram incubadas em agitador a 370 rpm por 22 horas em 1ml de meio Circle Grow (QBIO-GENE) contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3000 g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, lavou-se as células em 240 μl de meio GTE (2,6% [v/v] de Tris 1M [pH 7,4]; 2,0% [v/v] de EDTA 0,5M [pH 8,0] ;e 4,6% [v/v] de solução de glicose a 20% [v/v]) agitando-se em vórtex por 2 minutos. A lavagem foi repetida com 80 μl de GTE por 5 minutos.

Em prosseguimento ao protocolo , cerca de 60 μl de suspensão de células foram transferidas para placas do tipo ELISA contendo 50 μg de RNase (Ribonuclease A, Sigma). Em seguida, foram adicionados 60 μl de NaOH 0,2M/SDS 1%, e a solução descansou a temperatura ambiente por 10 minutos. Para se obter a lise das células, acrescentou-se 60 μl de solução gelada de KOAc (3M), e incubou-se a a placa a 90 °C

por 50 minutos. Depois, a mesma foi resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 g por 4 minutos.

Para eliminar os lisados celulares, uma placa-filtro (Millipore cat) foi fixada sobre a placa ELISA, e o conjunto (placa-filtro + placa ELISA) foi centrifugado a 4000 g por 4 minutos a 20 °C.

A lavagem do pellet foi feita com 110 μ l de isopropanol absoluto (4000 g por 45 minutos a 20 °C) e depois com 200 μ l de etanol 70% (4000 g por 5 minutos a 20 °C). A secagem consistiu na inversão da placa sobre papel absorvente, e posterior centrifugação, nesta posição, a 600 g por 1 minuto. Decorrido o tempo de secagem de 30 minutos, adicionou-se 60 μ l de água ultrapura autoclavada.

A qualidade e concentração de DNA de uma amostra aleatória dos plasmídios foram verificadas em gel de agarose. Utilizou-se 3 μ l dos plasmídios obtidos em comparação com um plasmídeo comercial (P-Gem 3Z, kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). As placas contendo os plasmídeos extraídos foram congeladas a -20 °C.

3.3.8 Sequenciamento dos insertos contendo microssatélites

Para a reação de sequenciamento foram usados os primers pUC/M13 direto ((5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3') e pUC/M13 reverso (5' TCACACAGGA-AACAGCTATGAC 3') adicionados aos reagentes do kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing version 3.1* (Applied Biosystems), conforme instrução do fabricante. Depois desta etapa, o sequenciamento foi feito no analisador ABI PRISM 3100 Genetic (Applied Biosystems). A qualidade das sequencias foi feita usando o programa Chromas lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

3.3.9 Desenho de primers para amplificação de microsatélites

Os primers foram desenhados com o programa primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Usando os seguintes parâmetros:

1. Temperatura de anelamento: de 50 a 65°C, sendo 58°C a temperatura ótima.
2. Conteúdo de GC: de 35 a 60%.
3. Tamanho do primer. De 18 a 20 pares de base.
4. Tamanho do produto: de 150 a 250 pares de bases, sendo 200 o tamanho ótimo.

3.4 Amplificação dos loci de microsatélites

3.4.1 Condições utilizadas na reação de PCR

Na reação de PCR o volume usado foi de 25 μ L e os reagentes foram adicionados nas seguintes concentrações: 10ng de DNA, 0,2 mM de dNTP, 0,5 μ M de cada primer e 1 U de *taq DNA polimerase*. As temperaturas de anelamento e as concentrações de MgCl₂ variaram de acordo com cada loco (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Condições de PCR para amplificação dos locos de microsatélites de *Aglaotenus lagotis*. TA(°C), Temperaturas de anelamento em graus centígrados; MgCl₂ (mM), concentração em milimolar de de cloreto de magnésio.

Locus	TA (°C)	MgCl2 (mM)
Ala1	56	1,8
Ala2	61	2,5
Ala3	50	3,0
Ala4	50	3,0
Ala5	52	3,0
Ala6	51	3,0
Ala7	50	2,8
Ala8	56	2,4

A ciclagem utilizada foi: 1) desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 2) 25 a 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica (vide Tabela 3.3)

por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e 3) extensão final a 72°C por dez minutos.

3.4.2 Eletroforese e genotipagem dos loci de microssatélites

A genotipagem dos indivíduos foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% em tampão TBE 1X e submetida à 150 V por 4 h. Os produtos de PCR foram comparados com marcadores de peso molecular de 10 e 50 pares de base (Invitrogen) para estimar o tamanho dos alelos. Após a corrida, os géis foram corados com prata seguindo protocolo de Creste *et al.* (2001). Em seguida a genotipagem foi feita pela leitura direta dos géis.

3.5 Amplificação por PCR do gene mitocondrial COI

3.5.1 Condições utilizadas na reação de PCR

Na reação de PCR o volume usado foi de 50 μ L e os reagentes foram adicionados nas seguintes concentrações: 15 ng de DNA, 3,0 mM de magnésio, 0,2 mM de dNTP, 0,4 μ M de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase.

Os primers utilizados foram: 1) C1-J-1751: 5'-GAGCTCCTGATATAGCTTTTCC-3' (Simon *et al.*, 1994); e 2) C1-N-2776: 5'-GGATAATCAGAATATCGTCGAGG-3' (Figura 3.2)(Hedin & Maddison, 2001).

A ciclagem utilizada foi: 1) desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 2) 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C 2 minutos; 3) e extensão final a 72°C por cinco minutos.

As reações de PCR foram verificadas em corrida em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídeo, e voltagem de 100 V por 40 minutos.

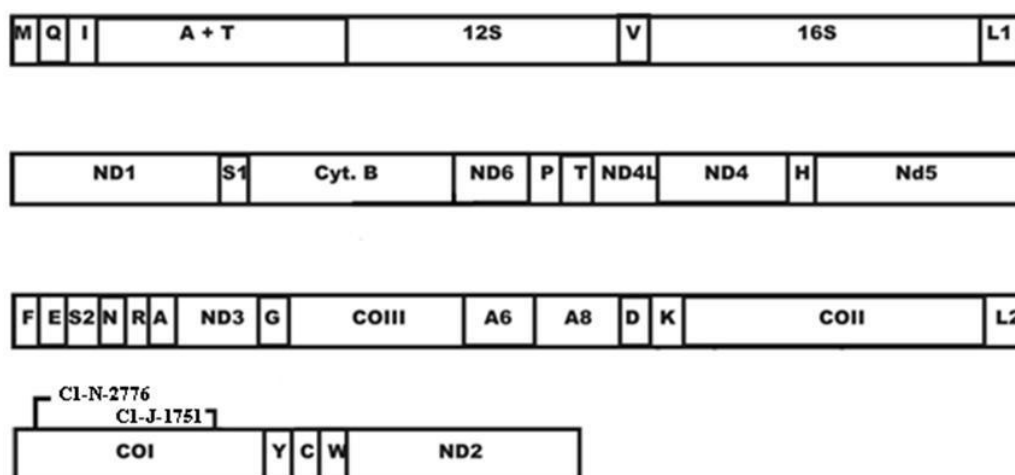


Figura 3.2: Representação gráfica do genoma mitocondrial padrão de animais. Em destaque a localização dos primers C1-J-1751 e C1-N-2776 utilizadas na amplificação do gene COI de *Aglaoctenus lagotis*.

3.5.2 Purificação dos fragmentos de PCR de COI para sequenciamento

As amostras de DNA foram purificadas usando a técnica de precipitação por PEG. As etapas do protocolo foram as seguintes: 1) adição de 50 μ L da solução de PEG (2% de PEG, 2,5 M NaCl) à reação de PCR; 2) incubação da mistura por 15 minutos a 37°C; 3) centrifugação por 15 minutos a 10.000 g; 4) descarte do sobrenadante; 5) adição de 125 μ L de etanol 80% e centrifugação por 2 minutos a 10.000 g; 6) repetição da etapa anterior; 7) secagem do etanol; 8) adição de 10 μ L de água ultrapura.

3.5.3 Sequenciamento do gene mitocondrial COI

Cerca de dez indivíduos de cada uma das cinco populações foram sequenciados. A reação de sequenciamento foi feita em ambas as direções usando os primers C1-J-1751 e C1-N-2776 a partir de DNA previamente purificado. O kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing version 3.1* (Applied Biosystems) foi utilizado, conforme instrução do fabricante, e o sequenciamento foi feito no analisador ABI PRISM 3100 Genetic (Applied Biosystems). A qualidade das sequencias foi feita usando o programa Chromas

lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

3.5.4 Verificação da presença de *Numts* nas seqüências

A integração nuclear do mtDNA que gera pseudogenes mitocondriais nucleares (*numts*) é um fenômeno relatado em vários táxons de eucariotos (Bensasson *et al.*, 2001). Segundo Richly & Leister (2004), cerca de 99% das seqüências mitocondriais depositadas no GenBank se transferiram para diferentes partes do genoma humano e de ratos. Além disso, foram relatados *numts* em várias ordens de insetos (Pamilo *et al.*, 2007; Black 4th & Bernhardt, 2009; Koutroumpa *et al.*, 2009), poríferos (Erpenbeck *et al.*, 2011) e aves (Kerr, 2010). Esses achados indicam que *numts* são comuns e que o uso de primers universais pode levar a co-amplificação do gene mitocondrial e de seus pseudogenes nucleares (Zhang & Hewitt, 1996; Bensasson *et al.*, 2001), resultando na superestimativa no número de espécies identificadas com base no gene COI (Song *et al.*, 2008).

Uma das estratégias usadas para identificar possíveis *numts* é a presença de códons de parada em regiões de quadro aberto de leitura (Song *et al.*, 2008). Nas seqüências obtidas neste trabalho não encontramos nenhuma indicação de interrupção de síntese do gene COI. Mesmo assim, não se pode eliminar por completo a possibilidade de inferências incorretas dos dados mitocondriais, sendo idealmente necessário conjugar fontes diferentes de informações (Song *et al.*, 2008). Caso os diferentes haplótipos fossem resultado da amplificação aleatória de cópias nucleares do gene COI dificilmente encontraríamos um padrão de estrutura genética semelhante nas análises de um marcador molecular independente. Como encontramos congruência nos dados de microsátélites é pouco provável é que tenham sido utilizados pseudogenes nucleares em nossas análises.

3.6 Análise dos dados

3.6.1 Dados obtidos com marcadores de microsatélites

O número de alelos por locus(A), e as heterozigozidades esperadas e observadas (H_O e H_E) foram analisadas usando o programa Genetix 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). O equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação foram testados (teste exato de Fisher) usando o programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Em seguida, os dados de ambos os testes foram submetidos a correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989). Os valores F_{ST} foram analisados usando o estimador θ de Weir & Cockerham (1984) com o programa fstat (Goudet, 1995). A frequência de alelos nulos foi calculada usando o programa Cervus version 3.0 (Marshall *et al.*, 1998). Os valores de F_{ST} corrigidos considerando alelos nulos foram estimados usando o programa FreeNa (Chapuis & Estoup, 2007). Para analisar o efeito das distâncias geográficas entre populações, uma matrix contendo estimativas de F_{ST} par a par foi comparada a uma matrix contendo as distâncias pareadas por meio do teste de Mantel (Mantel, 1967; Mantel & Valand, 1970), conduzido usando o programa GENEPOP versão 3.4. (Raymond & Rousset, 1995)

Foi utilizado o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) para definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos. Foram testados 10 arquivos de parâmetros contendo valores de $k=1$ à $k=10$, com dez corridas para cada valor de K, admitindo um modelo com mistura (pressupomos que as amostras de uma população não são isoladas das outras), frequências alélicas correlacionadas, 10.000 *burnins* e 100.000 simulações de Monte Carlo de cadeias de Markov (MCMC). A seleção do número K mais provável foi realizada através dos valores de ΔK , de acordo com o método proposto por Evanno *et al.* (2005).

3.6.2 Dados obtidos com marcador mitocondrial COI

O alinhamento das sequências do gene mitocondrial COI e foi feita utilizando o programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Os índices de diversidade, F_{ST} e testes de neutralidades do gene mitocondrial COI foram feitos usando ARLEQUIN 2.0. (Excoffier *et al.*, 2005)

A rede de haplótipos foi feita usando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). As relações genealógicas entre os indivíduos foram reconstruídas usando métodos filogenéticos por haverem grupos bem divergentes de indivíduos nas amostras. O modelo de substituição mais adequado às sequências foi definido como o de Hasegawa, Kishino, e Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), usando o critério de informação de Akaike (AIC) no programa ModelTest (Posada & Crandall, 1998). A filogenia foi reconstruída pelo método de máxima verossimilhança no programa GARLI (Zwickl, 2006) usando 1×10^6 gerações do algoritmo, 1000 interações, e 100 repetições de *bootstrapping* para determinar a confiabilidade de cada nó interno da árvore.

Foi feita uma análise de clados aninhados (NCA - *Nested Clade Analysis*), que possibilita inferências sobre a história demográfica das populações a partir da rede de haplótipos e sua distribuição geográfica, com o objetivo de diferenciar eventos históricos da estrutura genética das populações (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998, 2001). O programa GeoDis 2.2 (Posada *et al.*, 2000), que busca por associações significativas entre distâncias genéticas e geográficas, foi utilizado na análise. Foram realizados testes de contingência permutacional para todos os clados, além de estimativas de distâncias dos clados (D_c) e distâncias dos agrupamentos (D_n) (Templeton *et al.*, 1995).

4 Resultados

4.1 Biblioteca enriquecida com microsatélites

A partir da biblioteca construída foram obtidos 96 clones sendo que em 27 (28,12%) foram encontrados insertos com motivos de microssatélites maiores do que dez repetições. Desses, cinco possuíam repetições de mononucleotídeos (18,5%), e 22 de dinucleotídeos (81,5%) (Figura 4.1).

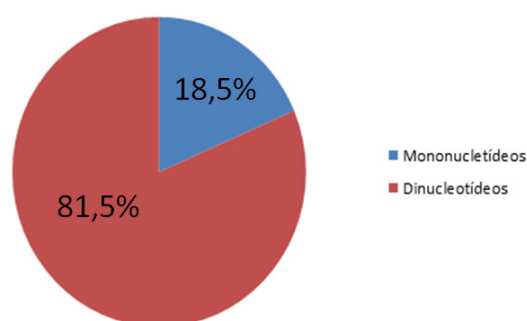


Figura 4.1: Proporção dos microsatélites encontrados, classificados pelo tamanho da unidade de repetição.

Em seguida, foram selecionadas 18 sequências com região flanqueadora adequada para o desenho dos primers direto e reverso (Tabela 4.1). Deste total, oito continham locos de microsatélites (44,4%) classificados como compostos, sete (38,9%) como perfeitos, e apenas três (16,7%) como interrompidos (Figura 4.2). Os primers sintetizados apresentaram em média 43,29% de GC, produtos com tamanho médio de 215,72 pares de bases, e temperatura média de dissociação (T_m) de 54,27°C.

Ao final do processo de padronização das reações de PCR, 8 das 18 sequências sintetizadas apresentaram amplicons polimórficos e foram usadas para caracterização de indivíduos em cinco populações de *A. lagotis*.

Tabela 4.1: Primers desenhados para amplificação de microsatélites de *Aglaoctenus lagotis*. Tm (°C), temperatura de dissociação; D sequência direta ; R, sequência reversa; produto, tamanho dos produtos de PCR em pares de base.

Loco	Motivo de repetição	Tm°C	Sequência dos primers		Produto	% GC	Classificação
A.lagotisMicrosat1	(CA)14(TA)6	54	D:CTTTCGAATTGCCTACCTT	R: TTGATGTCTACGATGTTGGA	209	41.0	Composto
A.lagotismicrosat2	(TA)4(TG)17	55	D:TTACGATGGATTACCGTGA	R:CCCACCATCTAGCAATGTA	244	44.7	Composto
A.lagotismicrosat3	(TC)14(CA)13	55	D:AACTTGCGCTAAAGGAAAC	R:GATGTGGGAGTGGATGAGT	176	47.4	Composto
A.lagotismicrosat4	(TA)5(GA)5GG (GA)7(GT)16	55	D:AACTAAGTCGTTTCGGTTGG	R:CGCCGAAGATGAAATAAA	169	43.1	Interrompido/ Composto
A.lagotismicrosat5	(TC)18(AC)7	55	D:TTTATCTGGGTCGTGCTTT	R:AAGATGCCTAGGAAGGTCA	182	44.7	Composto
A.lagotismicrosat6	(TG)15	54	D:AACTACTGGGCCGATCTTA	R:TGAATGTGGGTAATTTGTGA	234	41.2	Perfeito
A.lagotismicrosat7	(AC)5AT(AC)12	54	D:GCTGAGTCAACCTCTCAAA	R:TGTGTTCAATCACCAACAA	248	42.1	Interrompido/ Composto
A.lagotismicrosat9	(AC)17	53	D:CAACATGCATTTAACAACG	R:TTGTTACACCGTTCTTTTCG	239	38.6	Perfeito
A.lagotismicrosat10	(CA)12	51	D:AAACTTAACCTTCAGTGTCTG	R:ATCAATTCCCATGTGATCC	228	38.5	Perfeito
A.lagotismicrosat11	(CA)9(TA)3	55	D:ACCGCTCCTAATCAAACC	R:AAGTCGCCAAACGTTGTAT	203	46.0	Composto
A.lagotismicrosat 12	(TA)5 TGTA (TG)9	54	D:GCATGATGACAACCACAAT	R:TAGTTTAACTCGGCCTCCT	225	44.7	Interrompido/ Composto
A.lagotismicrosat13	(TG)11	55	D:TCATTCTTGAACGGCTACA	R:AGCAGAATAGGTTGGAAGG	235	44.7	Perfeito
A.lagotismicrosat14	(GT)11	55	D:CATCATGCCATCTCAAGC	R:CTTCGTGCAACAAATCAAT	201	43.4	Perfeito
A.lagotismicrosat15	(TG)11	55	D:CATTGTGTCCTCACGAAG	R:TCTCCGTTCTGATCTGATTT	240	43.7	Perfeito
A.lagotismicrosat16	(TC)20(AC)6	54	D:TTTATCTGGGTCGTGCTTT	R:AAGATGCCTAGGAAGGTCA	186	41.3	Composto
A.lagotismicrosat17	(TG)12	53	D:TCACTCGACATGAGTCCAC	R:ACAACATTTAGCACAGCAT	246	44.7	Perfeito
A.lagotismicrosat18	(CA)15(TA)3	55	D:TTCTGTTCTCGCAAATACG	R:TATTTGCCGGTGTAAGTCA	210	42.1	Composto

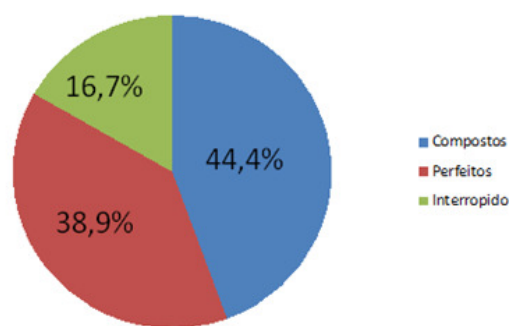


Figura 4.2: Proporção dos microsátélites encontrados, classificados pela composição.

4.2 Análise dos dados obtidos com marcadores de microssatélites

A genotipagem das cinco populações estudadas revelou a presença de 71 alelos, 18 deles (25,35%) em frequências inferiores a 5%, sendo considerados alelos raros (Tabela 4.2, Figura 4.3). Foram encontrados trinta e nove alelos privados (64,9%), ou seja, observados somente em uma das cinco populações (Figura 4.4).

O número médio de alelos por loco em todas as populações foi de 3,95 (Tabela 4.2). Os locos Ala4 e Ala5 não foram usados nas populações Ribeirão Cachoeira e Santo Antônio das Mangueiras (Anexo 1) devido a dificuldades experimentais. Os locos Ala7 e Ala8 não apresentaram polimorfismo na população Japi 1 assim como Ala1 e Ala5 na população de Valinhos (Figura 4.3).

A população Japi 1 apresentou maior número total de alelos (39), a maior quantidade de alelos privados (15) e raros (10) (Tabela 4.2, Figura 4.4). A população de Valinhos apresentou o menor número alelos (22), e o menor número de alelos raros junto com Japi 2 (Tabela 4.2, Figura 4.4).

Tabela 4.2: distribuição dos alelos de microsátélites nas populações estudadas. Número médio de alelos por loco (A), número de alelos totais (AT), privados (AP), e raros (AR).

População	A	AT	AP	AR
RC	4,67	28	8	4
ANT	3,83	23	6	2
VAL	2,75	22	8	1
Japi1	4,87	39	15	10
Japi2	3,62	29	1	1
Média	3,95			
Total		71	39	18

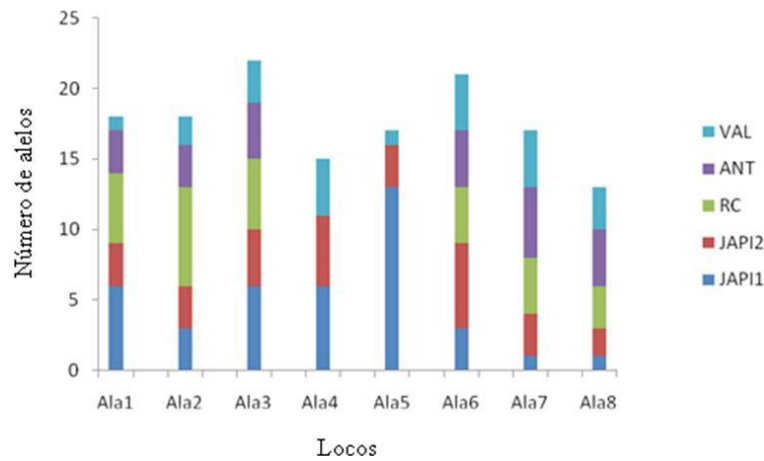


Figura 4.3: Número de alelos observados por loco e por população.

As heterozigotidades médias observada (H_O) e esperada (H_E) e os coeficientes de endogamia (F_{IS}) médios estão apresentados na Tabela 4.3. Foi detectada a presença de alelos nulos em todas as populações em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4.3). Apenas um par de locos (Ala7/Ala8), na população Ribeirão Cachoeira, apresentou desequilíbrio de ligação (Tabela 4.3). As estimativas das estatísticas F estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.3: Estimativas de diversidade genética. H_O , Heterozigozidade observada; H_E , Heterozigozidade esperada; F_{IS} , coeficiente de endogamia; DWH, locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg; DL, pares de locos em desequilíbrio de ligação. Valores entre parenteses nas colunas H_O e H_E correspondem ao desvio padrão e na coluna de F_{IS} ao intervalo de confiança de 95% determinado por Bootstrapping

População	H_O	H_E	F_{IS}	Locos com alelos nulos	DHW	DL
Japi1	0,328 (0,269)	0,505 (0,325)	0,354 (0,242-0,477)	Ala2, Ala3, Ala5, Ala6	Ala2, Ala3, Ala5, Ala6	-
Japi2	0,250 (0,138)	0,554 (0,217)	0,563 (0,408- 0,576)	Ala1, Ala2, Ala3, Ala4, Ala6, Ala7	Ala1, Ala3, Ala4, Ala6, Ala7	-
RC	0,242 (0,170)	0,638 (0,220)	0,628 (0,479- 0,697)	Ala1,Ala2 Ala3, Ala6, Ala7, Ala8	Ala1, Ala2, Ala3, Ala7, Ala8	(Ala7/Ala8)
ANT	0,296 (0,212)	0,549 (0,234)	0,470 (0,410- 0,636)	Ala2, Ala3, Ala6, Ala7, Ala8	Ala3, Ala7, Ala8	-
VAL	0,223 (0,213)	0,391 (0,283)	0,439 (0,215- 0,439)	Ala2, Ala3, Ala6, Ala7, Ala8	Ala3, Ala7, Ala8	-

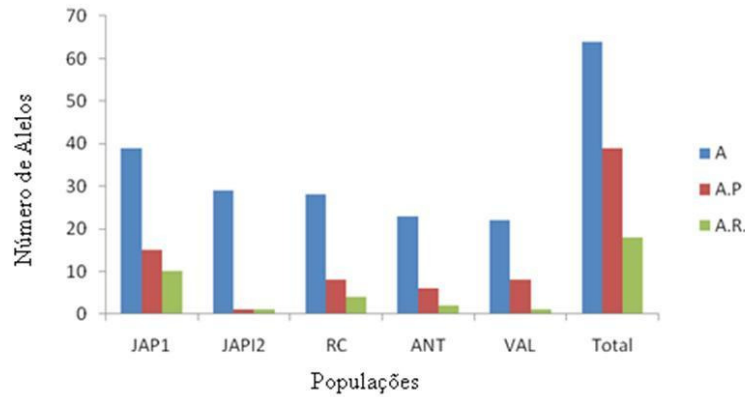


Figura 4.4: Número de alelos totais (A), alelos privados (AP) e raros (AR) observados nas cinco populações estudadas.

Tabela 4.4: Estimativas globais das estatísticas F_{IS} , coeficiente de endogamia; F_{IT} , coeficiente de endogamia total; F_{ST} , índice de fixação não corrigido e F_{ST}^* corrigido para a presença de alelos nulos. O intervalo de confiança, entre parênteses, de 95% foi determinado por Bootstrapping

F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{ST}^*
0,44 (0,332-0,552)	0,628 (0,516-0,724)	0,342 (0,240-0,430)	0,337 (0,225-0,438)

Os valores de F_{ST} par a par (Tabela 4.5, Anexo 4 e Anexo 5) variaram de 0,106 a 0,507 (valores corrigidos para alelos nulos). No teste de Mantel, não se encontrou correlação positiva entre o F_{ST} e a distância geográfica ($p = 0,784$; Figura 4.5).

Tabela 4.5: Valores de F_{ST} par a par das populações estudadas, dados de microsatélites. Entre parênteses estão os valores corrigidos para alelos nulos. Os intervalos de confiança são mostrados no Anexo 4 e no Anexo 5

	Japi1	Japi2	RC	ANT
JAPI2	0,112 (0,106)			
RC	0,182 (0,175)	0,115 (0,081)		
ANT	0,438 (0,429)	0,303 (0,287)	0,222 (0,204)	
VAL	0,512 (0,507)	0,423 (0,406)	0,341 (0,304)	0,166 (0,142)

O teste de atribuição populacional, indicou a presença de dois grupos (A e B) nas populações amostradas ($\Delta k = 2$, Figuras 4.6 e 4.7). A Figura 4.8 indica a localização

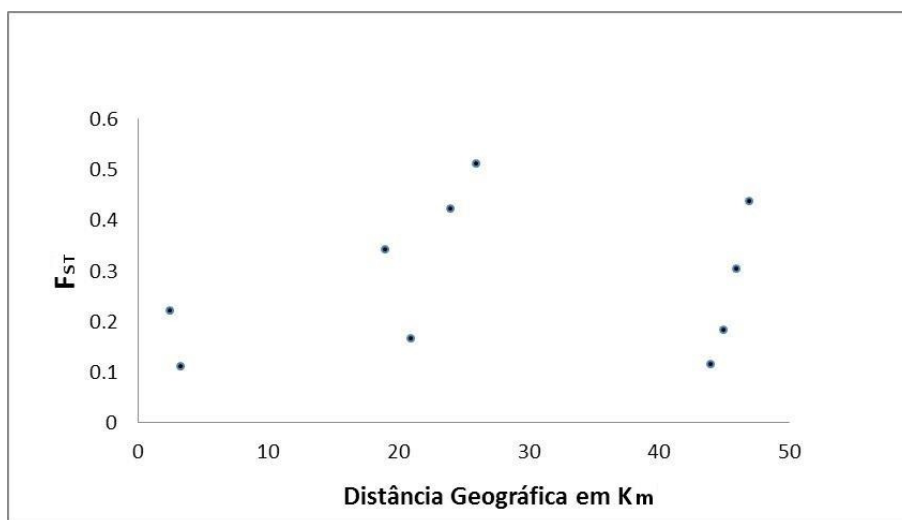


Figura 4.5: Correlação entre distâncias genéticas (F_{ST}) e geográficas nas populações de *A. lagotis*

geográfica dos Grupos A e B. A população Japi 1 e a maioria dos indivíduos das populações Japi 2 e Ribeirão Cachoeira são atribuídos ao Grupo A (em verde); enquanto que as populações Santo Antônio das Mangueiras e Valinhos pertencem a Grupo B (em vermelho).

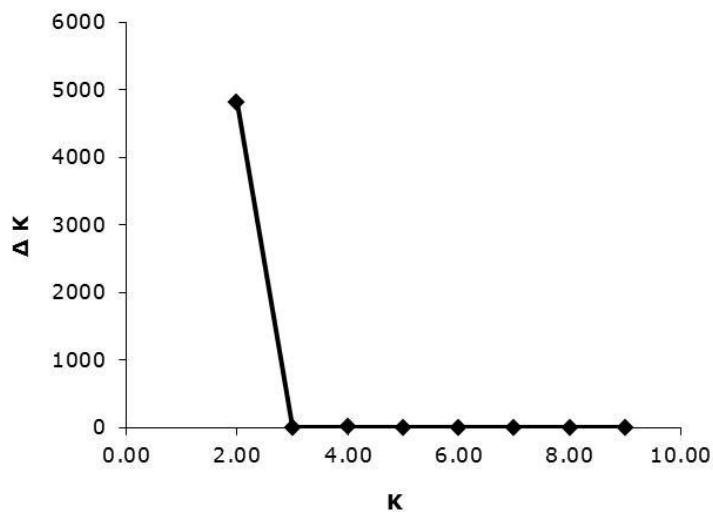


Figura 4.6: valores de ΔK para cada valor de K . O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo (Evanno *et al.*, 2005).

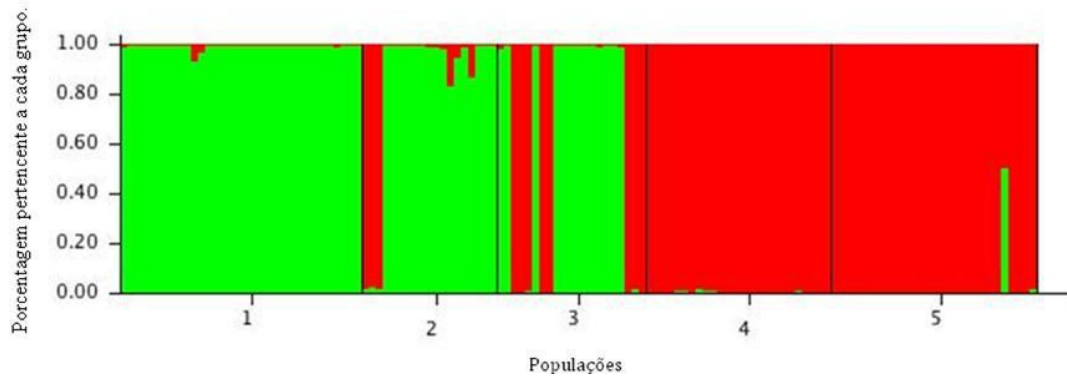


Figura 4.7: Teste de atribuição de grupos para populações de *Aglaoctenus lagotis* ($\Delta K = 2$). Os indivíduos estão representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo. Os números no eixo das abscissas indicam regiões geográficas onde foram coletados os indivíduos: 1) Japi 1; 2) Japi 2; 3) Ribeirão Cachoeira; 4) Santo Antônio das Mangueiras; 5) Valinhos. Representado em verde está o Grupo A, e em vermelho o Grupo B.

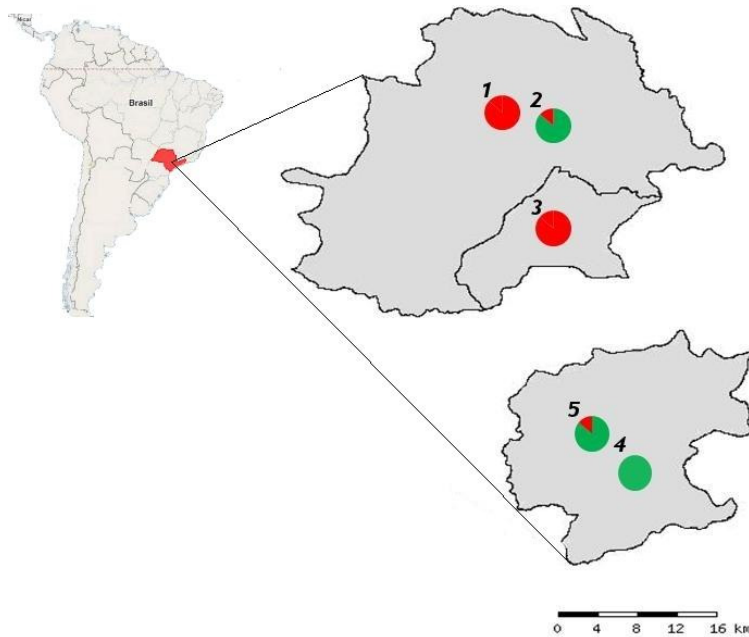


Figura 4.8: Localização dos indivíduos atribuídos ao Grupo A (verde) e ao Grupo B (vermelho). As localidades com as cores mistas possuem indivíduos atribuído aos dois grupos. Os números correspondem à localização geográfica: 1) Ribeirão Cachoeira; 2) Santo Antônio das Mangueiras; 3) Valinhos; 4) Japi 1 e 5) Japi 2.

4.3 Análises dos dados obtidos com sequenciamento do gene mitocondrial COI

A reconstrução filogenética feita com base nas sequências do gene COI está representada na Figura 4.9. Cada ramificação observada corresponde a um dos seis haplótipos encontrados (Figura 4.9 e 4.10). As sequências obtidas foram separadas em dois grandes clados significativos (100/100) com três haplótipos cada (Figura 4.9 e 4.10). Como apresentado na Figura 4.10, o haplótipo 1 foi encontrado nas populações Japi 1 e Ribeirão Cachoeira; o haplótipo 2 nas populações Japi 1, Japi 2 e Ribeirão Cachoeira; o haplótipo 3 apenas em Japi 2; o haplótipo 4 em todas as populações exceto Japi 1; o haplótipo 5 apenas em Valinhos; e o haplótipo 6 em Santo Antônio das Mangueiras e Valinhos.

Os valores de F_{ST} par a par das populações variam entre não significativos (pares Japi2 e Ribeirão Cachoeira; Valinhos e Santo Antônio das Mangueiras) e muito altos (pares Japi 1 e Santo Antônio das Mangueiras; e Japi 1 e Valinhos. Tabela 4.6).

Tabela 4.6: valores de F_{ST} par a par das populações estudadas, dados mitocondriais. Os valores assinalados com * são significativos.

	Japi1	Japi2	RC	ANT
Japi2	0,449*			
RC	0,503*	-0,065		
ANT	0,955*	0,540*	0,333*	
VAL	0,975*	0,515*	0,318*	0,155

4.4 Análises estatístico-genéticas dos dados obtidos com marcadores de microssatélites respeitando a divisão em grupos genéticos A e B

A partir das evidências que apontam a existência de dois grupos genéticos, as análises foram refeitas considerando a divisão em Grupos A e B. As populações Japi 2 e

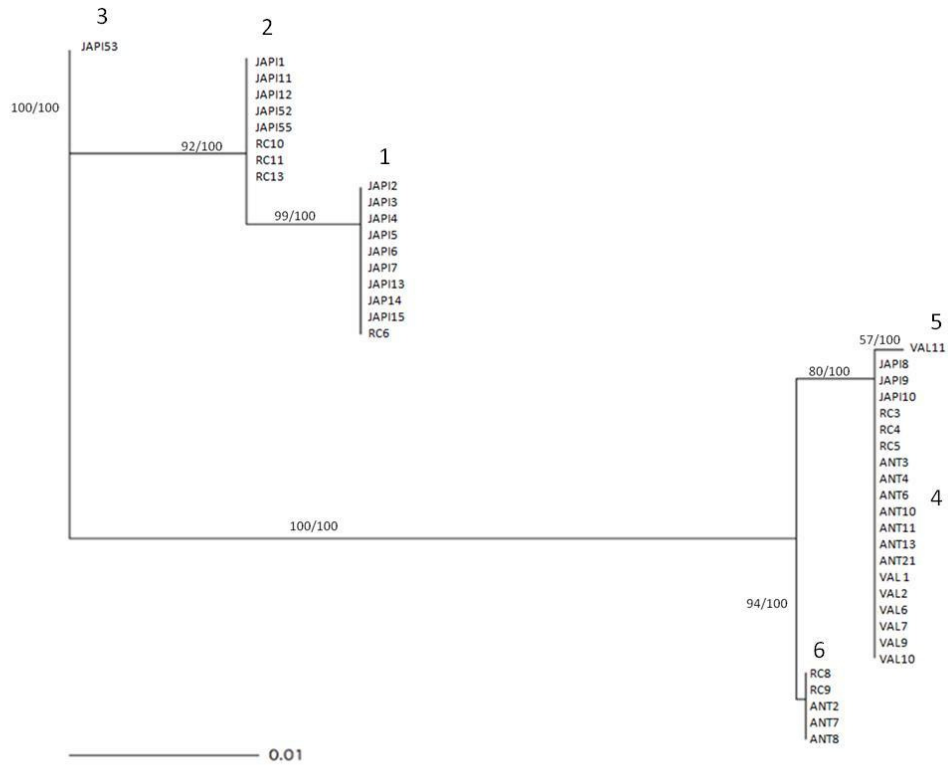


Figura 4.9: Reconstrução filogenética dos haplótipos do gene mitocondrial COI de *A. lagotis*. Os números de 1 a 6 correspondem aos haplótipos encontrados. A taxa de substituição nucleotídica está representada na escala. Os valores nos ramos representam a significância (*bootstrap*) de cada um.

Ribeirão Cachoeira possuem indivíduos de ambos grupos genéticos, porém a minoria (3 e 5 indivíduos respectivamente) pertencem ao Grupo B, os quais foram excluídos das análises. As heterozigozidades médias observada (H_O) e esperada (H_E) e os coeficientes de endogamia (F_{IS}) médios de ambos os grupos estão apresentados na Tabela 4.7, assim como os locos em desequilíbrio de Hardy-Weiberg e de ligação.

As estatísticas F também foram recalculadas considerando a separação em Grupos A e B. O F_{IS} estimado para o Grupo A foi de 0,413 e para Grupo B foi de 0,460 (Tabela 4.8). Os valores de F_{ST} foram corrigidos para alelos nulos. O valor encontrado para as populações do Grupo genético A é de 0,118 e para as populações do Grupo B de 0,142 (Tabela 4.8). O valor de F_{ST} entre os Grupos Genéticos A e B foi de 0,388 (Tabela 4.8)

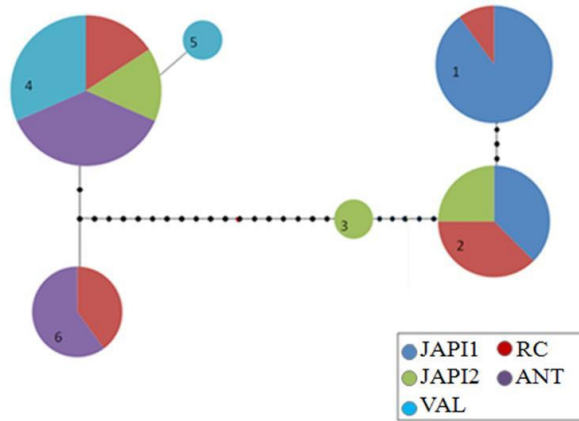


Figura 4.10: Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI de *A. lagotis*. Cada linha representa um passo mutacional e os pontos pretos representam os haplótipos inferidos não amostrados. Os números correspondem aos haplótipos encontrados. As cores representam as população em que foram encontrados cada haplótipo.

e os valores de F_{ST} par a par são apresentados na Tabela 4.9.

Foi verificada ainda a presença de alelos privados nos Grupo A e B. Observou-se que dos 71 alelos encontrados, 32 (45,07%) eram privados do Grupo A e 26 (36,62%) do Grupo B, o que totaliza 58 (81,69%) alelos privados (Tabela 4.10).

4.5 Análises dos dados obtidos do seqüenciamento do gene mitocondrial COI considerando a divisão em grupos genéticos A e B.

Foram encontrados três haplótipos únicos em cada grupo; a diversidade haplotópica do Grupo A foi de 0,573 e do Grupo B de 0,395 (Tabela 4.11). A diversidade nucleotídica dos grupos não foram estatisticamente diferentes, assim como o número de diferenças par a par (Tabela 4.11). Os testes de neutralidade, D de Tajima e F_s de Fu, não foram significativos ($p > 0,05$; Tabela 4.11), indicando que a seqüências evoluem de acordo com o esperado para o modelo de neutralidade. Os valores de F_{ST} par a par

Tabela 4.7: Estimativas de diversidade genética considerando a presença dos Grupos A e B. H_O , Heterozigozidade observada; H_E , Heterozigozidade esperada; F_{IS} , coeficiente de endogamia; Nulos, locos com alelos nulos; DWH, locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg; DL, pares de locos em desequilíbrio de ligação. Valores entre parentes nas colunas H_O e H_E correspondem ao desvio padrão e na coluna de F_{IS} ao intervalo de confiança de 95% determinado por Bootstrapping.

População	Grupo	H_O	H_E	F_{IS}	locos com alelos nulos	DHW	DL
Japi1	A	0,328 (0,269)	0,505 (0,325)	0,354 (0,242-0,477)	Ala2, Ala3, Ala5, Ala6	Ala2, Ala3, Ala5, Ala6	-
JAPI2A	A	0,188 (0,178)	0,382 (0,267)	0,562 (0,265- 0,738)	Ala1,Ala3, Ala4, Ala6	Ala1, Ala3, Ala6	-
RCA	A	0,188 (0,205)	0,498 (0,296)	0,635 (0,463- 0,812)	Ala1, Ala2, Ala3,Ala6, Ala7	Ala1,Ala3, Ala7	-
Média		235	462	517			
ANT	B	0,296 (0,212)	0,549 (0,234)	0,470 (0,410- 0,636)	Ala2, Ala3, Ala6, Ala7, Ala8	Ala3, Ala7, Ala8	-
VAL	B	0,223 (0,213)	0,391 (0,283)	0,439 (0,215- 0,439)	Ala2, Ala3, Ala6, Ala7, Ala8	Ala3, Ala7, Ala8	-
Média		260	470	454			

Tabela 4.8: Estatísticas F considerando a presença dos Grupos A e B. F_{IS} , coeficiente de endogamia; F_{IT} , coeficiente de endogamia total; F_{ST} , índice de fixação não corrigido e F_{ST}^* corrigido para a presença de alelos nulos. O intervalo de confiança, entre parênteses, de 95% foi determinado por Bootstrapping.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{ST}^*
Grupo A	0,413 (0,311-0,543)	0,492 (0,376-0,657)	0,136 (0,054-0,198)	0,118 (0,027-0,193)
Grupo B	0,460 (0,263-0,539)	0,548 (0,441-0,652)	0,166 (0,072-0,242)	0,142 (0,042-0,223)
Grupo A X B			0,398 (0,261-0,512)	

Tabela 4.9: Valores de F_{ST} par a par das populações de *A. lagotis* considerando a divisão em Grupos A e B, dados de microsátélites. Entre parênteses correção para alelos nulos. Em cinza estão as populações do Grupo A, em preto as populações do Grupo B.

	Japi 1	Japi 2A	RCA	ANT
Japi 2A	0,101 (0,93)			
RCA	0,145 (0,113)	0,183 (0,168)		
ANT	0,438 (0,429)	0,431 (0,425)	0,349 (0,336)	
VAL	0,512 (0,507)	0,530 (0,521)	0,458 (0,440)	0,166 (0,142)

encontrados variaram desde não estruturados (valores não significativos) até altamente estruturados (Tabela 4.12).

O aninhamento hierárquico dos halótipos para realização da *Nested Clade Analysis* (NCA) está apresentado na Figura 4.11. O teste de contingência permutacional apontou valores significantes em dois clados (incluindo o cladograma total), para os quais a hipótese nula de não associação geográfica deve ser rejeitada (Tabela 4.13 e Figura 4.11).

Tabela 4.10: Alelos de microssatélites privados dos Grupos A e B. Grupo A e B amplitude, corresponde à variação de tamanho dos alelos em pares de bases encontrados em cada grupo respectivamente; alelos privados A e B, número de alelos privados encontrados em cada grupo respectivamente.

Loco	Grupo A amplitude (bp)	Grupo B amplitude (bp)	Alelos Privados A	Alelos Privados B	Total
Ala1	245-300	245-278	4	1	7
Ala2	212-232	205-332	4	1	8
Ala3	215-300	215-235	6	5	12
Ala4	230-248	185-230	4	5	11
Ala5	210-338	240-290	11	2	14
Ala6	170-190	170-190	2	1	6
Ala7	205-235	225-240	1	7	8
Ala8	229	222-232	0	4	5
total			32	26	71

Tabela 4.11: Resumo dos dados genéticos mitocondriais dos Grupos A e B de *A. lagotis*.

	Grupo A	Grupo B
Tamanho amostra	19	25
No de haplotipos	3	3
No de haplotipos únicos	3	3
Diversidade Haplotípica	0,573 +/- 0,061	0,397 +/- 0,102
Diversidade Nucleotídica	0,004 +/- 0,002	0,002 +/- 0,001
No médio diferenças par a par	2,737 +/- 1,518	1,080 +/- 0,736
Teste D de Tajima	-0,154 (p>0,05)	0,052 (p>0,05)
Teste Fs de Fu	4,337 (p>0,05)	1,640 (p>0,05)

Tabela 4.12: Valores de F_{ST} par a par das populações de *A. lagotis* considerando a divisão em Grupos A e B, dados mitocondriais. Os valores assinalados com * são significativos. Em cinza estão as populações do Grupo A e em preto do Grupo B.

	Japi1	Japi 2A	Japi 2B	RCA	RCB	ANT
Japi 2A	0,718 *					
Japi 2B	0,973 *	0,932 *				
RCA	0,577 *	-0,005	0,950 *			
RCB	0,954 *	0,910 *	0,118	0,923 *		
ANT	0,955 *	0,927 *	0,019	0,936 *	0,15	
VAL	0,975 *	0,951 *	-0,167	0,964 *	0,281	0,155

Tabela 4.13: Teste de contingência permutacional da *Nested Clade Analysis* (NCA). Os clados que apresentaram valores de associação geográfica significantes ($p < 0,05$) estão marcados com (*).

Clado	X ²	Probabilidade	
1-16	1,81	1,000	
2-8	4,38	0,256	
3-1	10,03	0,002	*
4-1	2,55	0,410	
Cladograma total	28,29	0,000	*

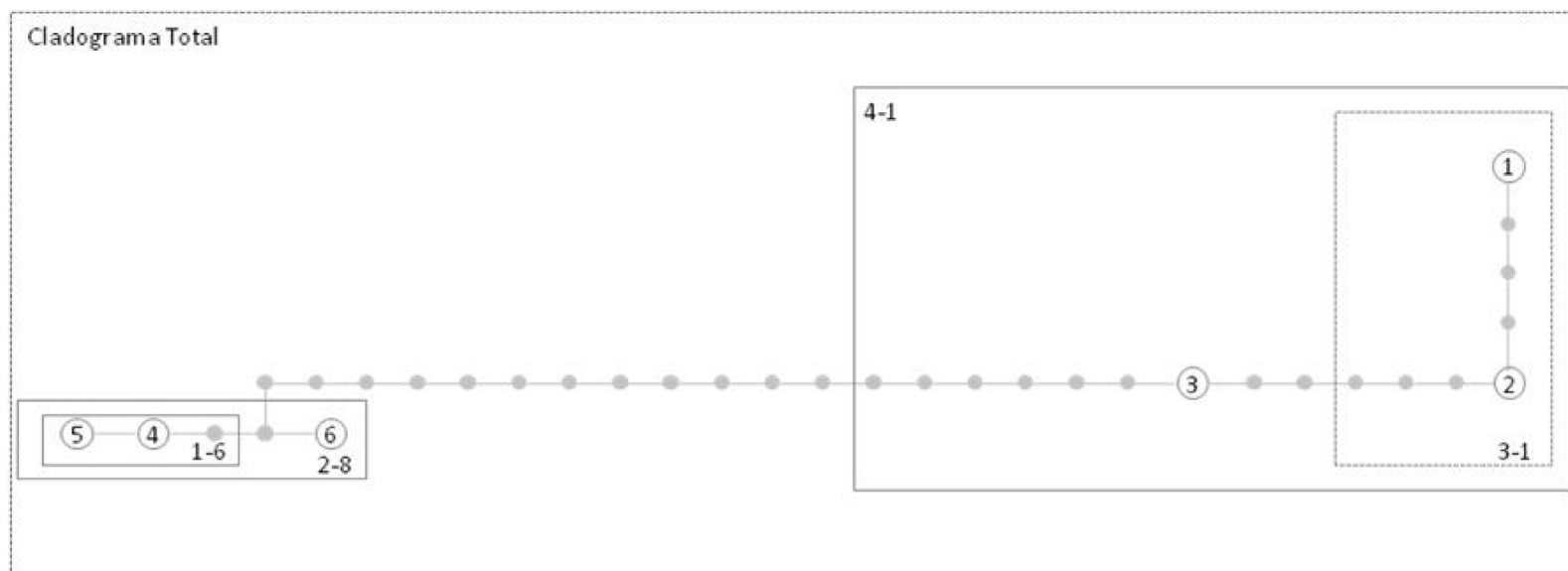


Figura 4.11: Rede de haplótipos de *A. lagotis* e aninhamento hierárquico. Cada linha representa um passo mutacional e os pontos pretos representam os haplótipos inferidos não amostrados. Foram representados apenas os clados com variação genética ou geográfica, ou seja, que contém haplótipos encontrados na população. Os clados que apresentaram valores de associação geográfica significativos encontram-se tracejados.

5 Discussão

5.1 Diversidade Genética em *Aglaoctenus lagotis*

As heterozigozidades médias observada e esperada (H_O e H_E) foram de 0,388 e 0,609 respectivamente, valores intermediários aos encontrados em espécies de aranhas da família Lycosidae (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Diversidade em espécies da família Lycosidae estimadas com dados de microsátélites.

Espécie	H_O	H_E
<i>Arctosa sancterosae</i> (Hataway et al. 2010)	0,279	0,299
<i>Pardosa sierra</i> (Ramirez et al. 2010)	0,811	0,892
<i>Agaloctenus lagotis</i>	0,388	0,609

Em contrapartida ao encontrado em outras espécies de Lycosidae, observamos em nossos dados um desvio significativo da heterozigozidade em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A presença de alelos nulos verificada nos locos estudados poderia justificar esta observação, já que os indivíduos seriam interpretados erroneamente como homozigotos. Entretanto, a interpretação de que os genótipos analisados estão submetidos à forte endogamia é compatível com o modo de vida da espécie, e será discutida posteriormente com mais detalhes.

5.2 Grupos genéticos A e B de *Aglaoctenus lagotis*

As análises dos dados obtidos com marcadores de microsátélites indicaram a presença de dois grupos (Figuras 4.8 e 4.6). De forma semelhante, a presença de dois grupos com características genéticas diferentes foi observada na reconstrução filogenética do gene COI. A divisão observada foi congruente em ambos os marcadores estudados;

isto é, os indivíduos atribuídos ao Grupo A na análise com microsatélites encontram-se em um único clado da reconstrução filogenética de COI, ocorrendo o mesmo com o Grupo B (Figuras 5.1 e 5.2).

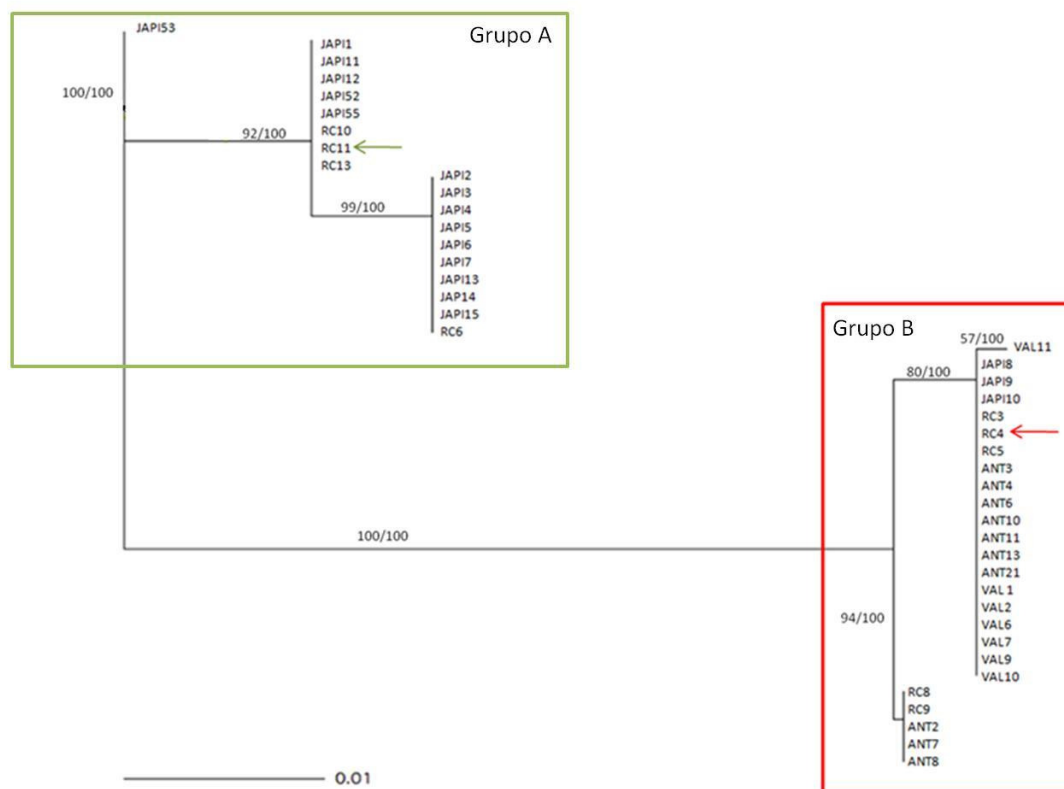


Figura 5.1: Análise comparativa dos dados obtidos com os marcadores nuclear e mitocondrial. Em verde estão indicados os indivíduos do Grupo A e em vermelho do Grupo B. A seta verde indica o indivíduo 11 da população de Ribeirão Cachoeira, enquanto que a seta vermelha indica o indivíduos 4 da mesma região geográfica. A taxa de substituição nucleotídica está representada na escala. Os valores nos ramos representam a significância (*bootstrap*) de cada um.

As análises considerando os dois grupos genéticos apresentam evidências adicionais que apoiam a existência de duas linhagens evolutivamente independentes em nossas amostras.

Com marcadores microssatélites, os valores de F_{ST} dos Grupos A e B são significativamente menores que o valor de F_{ST} sem considerar a distinção dos grupos (Tabelas 4.3 e 4.7). Além disso, o F_{ST} entre os Grupos Genéticos A e B é significativamente maior

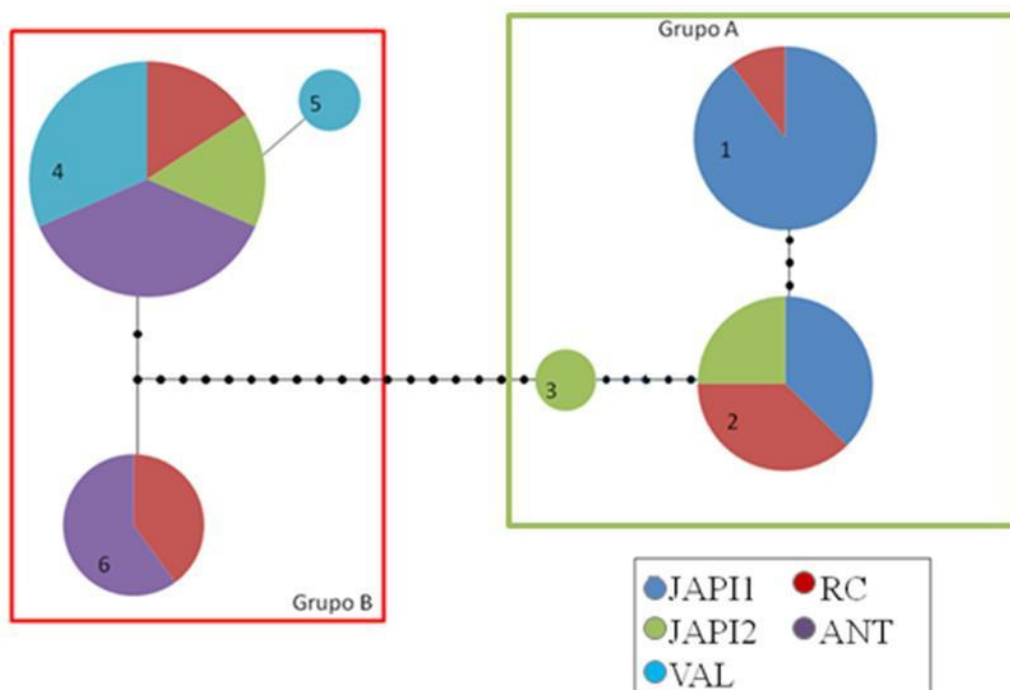


Figura 5.2: Rede de haplótipos mostrando os Grupos A e B. Cada linha representa um passo mutacional e os pontos pretos representam os haplótipos inferidos não amostrados.

do que o observado entre as populações de cada grupo (Tabela 4.7).

Nas análises dos dados mitocondriais foram encontrados resultados semelhantes. Enquanto o F_{ST} entre os grupos foi muito alto, com um F_{ST} médio de 0,946, no Grupo A, a média dos valores de F_{ST} é de 0,430 e no Grupo B não há estruturação entre as populações, com valores de F_{ST} não significativos (Tabela 4.12).

Nos dados de microsatélites, a alta estruturação entre grupos pode ser relacionada à alta porcentagem (82,3%) de alelos privados (Tabela 4.10) e nos dados mitocondriais pela presença de haplótipos exclusivos em cada grupo (Tabela 4.11).

Ainda nos dados de microsatélites, o desequilíbrio de ligação em um par de locos (Ala7/Ala8) encontrado na população Ribeirão Cachoeira só é detectado quando os grupos não estão discriminados. Isso, juntamente com os níveis de estruturação encon-

trados, aponta para a existência de pouco ou nenhum fluxo gênico entre as populações dos Grupos A e B.

Na tradução das sequências obtidas do gene COI, observou-se a presença de um aminoácido polimórfico; enquanto que no Grupo A os indivíduos possuem uma Serina na posição 212 da proteína codificada pelo COI, no Grupo B uma Prolina é encontrada (Tabela 5.2). A exceção é apenas um indivíduo da população Japi2A (Japi53), único representante do haplótipo três (Figura 5.2). Apesar de ser atribuído ao Grupo A pelas análises dos dados de microssatélites, este possui o aminoácido Prolina indicativo do Grupo B. Na reconstrução filogenética aparece em um ramo significativo e isolado dos demais indivíduos do Grupo A (Figura 5.1).

Tabela 5.2: Trecho da sequência de aminoácidos da proteína COI. A substituição S por P no aminoácido 212 da proteína COI está indicada em verde no Grupo A e em vermelho para no Grupo B.

Grupo Genético	Substituição de aminoácido da proteína COI
<i>Aglaotenus lagotis</i> A	WMATLHGSFFKLNT ^S LMWCIGFVFLFT
<i>Aglaotenus lagotis</i> B	WMATLHGSFFKLNT ^P LMWCIGFVFLFT

O gene COI tem sido muito estudado em animais, particularmente em relação às diversidades inter e intraespecíficas. Entre pares de espécies do mesmo gênero, Hebert *et al.* (2003) mostraram que em 98% delas, a divergência no gene COI é maior do que 2%. Em 361 espécies de 19 gêneros de aranhas, foi observada uma divergência intraespecífica média de 2,15% na sequência do gene COI, enquanto a divergência interespecífica média foi de 6,77% (Robinson *et al.*, 2009). Na família Lycosidae a divergência média entre espécies do mesmo gênero foi de 2,84% (Robinson *et al.*, 2009).

Os haplótipos do gene COI dos Grupos A e B apresentam uma divergência média de 3,7%; compatível com a divergência entre espécies diferentes. Além disso, a divergência dentro dos grupos (Grupo A = 1,01%; Grupo B = 0,04%) é muito menor do que entre

grupos (3,7%), o que é descrito como barcode gap (Robinson *et al.*, 2009), um intervalo bem marcado entre divergência inter e intraespecíficas. No entanto, o indivíduo Japi 53 diverge em média apenas 1,16% do Grupo A, valor que não justifica a existência de um terceiro grupo genético.

A taxa de divergência de sequências mitocondriais pareadas em artrópodes foi estimada por Brower (1994) em 2,3% por milhão de anos, considerando possíveis variações em determinados táxons. Assim, o tempo de divergência entre os Grupos A e B pode ser estimado em cerca de 1,6 milhões de anos, indicando que podem ser espécies diferentes.

Os dois grupos genéticos não são significativamente diferentes quanto às estimativas de variabilidade genética e estruturação (H_E , F_{IS} , F_{ST}), incluindo os dados dos marcadores mitocondriais (diversidades haplotípicas e nucleotídicas). Assim, podemos inferir que os indivíduos de ambos os grupos genéticos devem possuir comportamentos de dispersão e sistemas reprodutivos semelhantes.

5.3 Estrutura intrapopulacional em *A. lagotis*

Mutações nos sítios de anelamento dos primers podem ocorrer e certos alelos podem não ser amplificados (alelos nulos), resultando em falsos homozigotos (Shaw *et al.*, 1999). Tais erros de genotipagem podem causar desvios nas proporções de Hardy-Weinberg, em particular na deficiência de heterozigotos, potencialmente enviesando a análise genética da população. O excesso de homozigotos encontrado em nossos resultados (Tabela 4.7) poderia ser justificado pela presença de alelos nulos, porém a interpretação de que seja reflexo de processos endogâmicos nas populações não pode ser descartada. De fato, os desvios causados pela presença de alelos nulos são geralmente muito similares aos causados por endogamia, acasalamento não-aleatório e efeito Wahlund. Além disso, aspectos ecológicos e comportamentais de *A. lagotis* são compatíveis com os altos valores de F_{IS} encontrados.

O coeficiente de endogamia médio encontrado em *A. lagotis* é ainda maior do que em *Rabidosa rabida*, também da família Lycosidae ($F_{IS} = 0,180$, Reed *et al.* (2011)), cuja alta endogamia foi atribuída às limitações da dispersão cursorial. De forma semelhante, os altos valores de F_{IS} encontrados em *A. lagotis* devem refletir fatores ecológicos que restrinjam sua dispersão.

As teias destas aranhas, em forma de tubo, são construídas em locais preferencialmente úmidos e com baixa exposição ao sol (Rubio & Torres, 2003). Um fator importante para distribuição dessa espécie parece ser a abundância de alimento: as teias de *A. lagotis* possuem distribuição bastante agregada em locais com recursos abundantes, que se torna mais espaçada em ambientes de alimento mais escasso (Pellegrino *et al.*, 2005). Essas e outras características favorecem a concentração das fêmeas e suas proles, apesar do aumento potencial da competição e da endogamia.

Johannesen & Lubin (2001) observaram a presença de unidades familiares dentro das populações de *Stegodyphus lineatus* (Araneae, Eeresidade). Os juvenis desta espécie se estabelecem e mais tarde se reproduzem perto na teia materna, comportamento que gera uma subestruturação populacional refletida na deficiência de heterozigotos na população geral. Da mesma forma, a dispersão de *A. lagotis* parece acontecer de forma restrita, uma vez que as formas juvenis constroem suas teias próximas à teia materna (Santos & Brescovit, 2001). As fêmeas de *A. lagotis* apresentam cuidados maternos, raro em aranhas, o que contribui para agregação dos juvenis (Souza, 2007). É possível que *A. lagotis* possua certo nível de cooperação familiar o que levaria à diminuição da dispersão e consequentemente à um aumento das taxas de endogamia.

5.4 Conectividade entre populações em *A. lagotis*

A conectividade entre populações de *A. lagotis* será discutida apenas dentro dos grupos, uma vez que constituem linhagens genéticas distintas. Considerando os dados

mitocondriais não se observou estruturação entre as populações do Grupo Genético B (Tabela 4.12). No Grupo A, verificou-se estruturação apenas entre Japi 1 e demais populações. Apesar disso, Japi 1 não possui haplótipos exclusivos, e a estruturação observada ocorre devido às diferentes frequências de cada haplótipo. Na análise de clados agrupados, observou-se que o clado 3-1 (Grupo A) apresenta maior restrição geográfica do que o esperado, indicando a necessidade de novos estudos incluindo uma área mais ampla.

Os dados de microssatélites revelaram valores moderados de estruturação dentro dos grupos. De acordo com Slatkin (1985) calculamos o número de migrantes (N_m) por geração entre as populações do Grupo A ($N_m = 1,86$) e B ($N_m = 1,51$).

Apesar de indicarem valores de F_{ST} levemente discrepantes, dados de ambos marcadores sugerem que as populações não estão completamente isoladas, apesar das distâncias e da presença de ambientes inóspitos entre elas, como estradas, cidades e fazendas. De fato, observamos espécimes de *Aglaoctenus lagotis* muitas vezes, ao longo deste estudo, em jardins de áreas urbanas, indicando que a dispersão aérea, já descrita para família Lycosidae (Greenstone, 1982), deve também ocorrer nesta espécie.

Trabalhos realizados com aranhas mostraram baixa estruturação populacional. Em alguns deles, foram relatadas trocas gênicas em paisagens fragmentadas entre populações distantes em até 25 quilômetros (Ramirez & Fandino, 1996; Ramirez & Haakonsen, 1999). Assim, as aranhas poderiam se dispersar por grandes distâncias, sendo capazes de uma segunda tentativa de balonismo caso aterrissassem em terreno pouco favorável.

Apesar de ser comum observar balonismo nos juvenis; a propensão a este tipo de dispersão pode aumentar em habitats com recursos limitados (Bonte & Maelfait, 2001). Desta forma, pequenas manchas de vegetação, mesmo em áreas urbanas poderiam ser alcançadas, produzindo pequenas ilhas de colonização entre os fragmentos. Assim, *Aglaoctenus lagotis*, descrita como exigente para a escolha do habitat, conseguiria se estabelecer na matriz mantendo a conectividade entre as populações.

O balonismo e o movimento cursorial dos machos no período de reprodução (Santos & Brescovit, 2001) devem permitir certo fluxo gênico entre as populações, embora o comportamento de agregação e o cuidado parental mantenham a alta taxa de endocruzamento dentro das populações.

6 Conclusão

- Nas populações estudadas foram encontrados dois Grupos (A e B) indicados por ambos marcadores moleculares (microssatélites nucleares e gene mitocondrial CO1), tratando-se possivelmente de espécies diferentes. Assim, uma revisão taxonômica do gênero *Aglaoctenus* deve ser considerada.
- Os grupos genéticos devem possuir níveis de diversidade genética, endogamia e estruturação diferentes, o que pode indicar comportamentos dispersivos e sistemas de reprodução semelhantes.
- Os altos níveis de endogamia encontrados em ambos os grupos, refletem uma distribuição agregada da população que se mantém apesar do aumento potencial da competição.
- Mesmo que seja insuficiente para evitar a alta taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados dentro de cada população, a dispersão aérea permite que as populações mantenham sua conectividade mesmo em um habitat fragmentado.

Bibliografia

- Alessandrini, F., M. Mazzanti, V. Onofri, C. Turchi, and A. Tagliabracci (2008). MtDNA analysis for genetic identification of forensically important insects. *Forensic Science International: Genetics* 1, 584–585.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history, and evolution* (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489–522.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous windows tm pour la génétique des populations.
- Bensasson, D., D.-X. Zhang, D. L. Hartl, and G. M. Hewitt (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16, 314–321.
- Bidegaray-Batista, L., N. Macias-Hernandez, P. Oromi, and M. A. Arnedo (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.
- Billotte, N., P. J. L. Lagoda, A. M. Risterucci, and F. C. Baurens (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277–288.
- Black 4th, W. C. and S. A. Bernhardt (2009). Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (numts) in *Aedes aegypti* genome. *Insect Mol Biol* 18(6), 705–13.
- Bonte, D. (2009). Inbreeding depresses short and long distance dispersal in three congeneric spiders. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 1429–1434.
- Bonte, D. and J.-P. Maelfait (2001). Life history, habitat use and dispersal of a dune wolf spider *Pardosa monticola* [clerck, 1757] (lycosidae, araneae) in the flemish coastal dunes [belgium]. *Belgian Journal of Zoology* 131, 145–157.
- Borges, S. H. and A. D. Brescovit (1996). Inventário preliminar da aracnofauna (Araneae) de duas localidades na Amazonia Ocidental 12, Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi.
- Brescovit, A. D. (1999). Araneae. In C. R. F. Brandão and E. M. Vasconcelos (Eds.), *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX*, pp. 45–56. São Paulo: Fapesp.
- Brescovit, A. D., R. Bertani, R. Pinto-da Rocha, and R. C. A (2004). *Aracnideos da Estacao Ecologica Jureia-Itatins: Inventario preliminar e historia natural*, pp. 198–221. Ribeirao Preto: Holos.
- Brooks, T. and A. Balmford (1996). Atlantic forest extinctions. *Nature* 380, 115.

- Brooks, T. M., R. A. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, J. Gerlach, M. Hoffmann, J. F. Lamoreux, C. G. Mittermeier, J. D. Pilgrim, and A. S. L. Rodrigues (2006). Global biodiversity conservation priorities. *Science* 313, 58–61.
- Brower, A. V. Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial dna evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 6491–6495.
- Brown, W. M., M. George, and A. C. Wilson (1979). Rapid evolution of mitochondrial dna. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 1967–1971.
- Brown Jr., K. S. and G. G. Brown (1992). Habitat alteration and species loss in brazilian forests. In T. C. Whitmore and J. A. Sayer (Eds.), *Tropical deforestation and species extinction*, pp. 119–142. Londres: Chapman and Hall.
- Chapuis, M-P. and A. Estoup (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621–630.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1659.
- Colgan, D. J., S. Brown, R. E. Major, F. Christie, M. R. Gray, and C. G (2002). Population genetics of wolf spiders of fragmented habitat in the wheat belt of New South Wales. *Molecular Ecology* 11, 2295–2305.
- Collingham, Y. C. and B. Huntley (2000). Impacts of habitat fragmentation and patch size upon migration rates. *Ecological Applications* 10, 131–144.
- Collins, M. (1990). *The last rain forests*. London: Mitchell Beazley Publ./IUCN.
- Colombo, A. F. and C. A. Joly (2010). Brazilian atlantic forest lato sensu: the most ancient brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology* 70(3), 697–708. Suppl.0.
- Creste, S., A. Tulmann Neto, and A. Figueira (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 299–306.
- Dara Newman, D. P. (1997). Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *clarkia pulchella*. *Evolution* 51(2), 354–362.
- Dean, W. (1995). *With broadax and firebrand: the destruction of the Brazilian Atlantic Forest*. Berkeley: University of California Press.
- Decae, A. E. (1987). *Dispersal: Ballooning and other mechanisms*, pp. 348–356. New York: Springer-Verlag.

- Dixo, M., J. P. Metzger, J. S. Morgante, and K. R. Zamudio (2009). Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the brazilian atlantic coastal forest. *Biological Conservation* 142, 1560–1569.
- Erpenbeck, D., J. N. A. Hooper, and G. Worheide (2005). COI phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'- Are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes* 6, 550–553.
- Erpenbeck, D., O. Voigt, M. I. Adamsk, B. J. Woodcroft, J. N. A. Hooper, G. Worheide, and B. M. Degnan (2011). Numts in the sponge genome reveal conserved transposition mechanisms in metazoans. *Mol. Biol. Evol.* 28(1), 1–5.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34, 487–515.
- Ferreira, M. E. and D. Grattapaglia (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- Filgueiras, B. K. C., L. Iannuzzi, and I. R. Leal (2011). Habitat fragmentation alters the structure of dung beetle communities in the atlantic forest. *Biological Conservation* 144, 362–369.
- Foelix, R. F. (1982). *Biology of Spiders*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Foelix, R. F. (1996). *Biology of Spiders*. New York: Oxford University Press.
- Foley, J. A., R. DeFries, G. P. Asner, C. Barford, G. Bonan, S. R. Carpenter, F. S. Chapin, M. T. Coe, G. C. Daily, H. K. Gibbs, J. H. Helkowski, T. Holloway, E. A. Howard, C. J. Kucharik, C. Monfreda, J. A. Patz, I. C. Prentice, N. Ramankutty, and P. K. Snyder (2005). Global consequences of land use. *Science* 309(5734), 570–574.
- Ford, M. J. (1978). Locomotory activity and the predation strategy of the of the wolf-spider pardosa amentata (clerck) (lycosidae). *Animal Behaviour* 26(1), 31–35.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126(2), 131–140.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe (2002). *Introduction to conservation genetics* (2nd ed.). Cambridge: Harvard University Press.
- Fundação SOS Mata Atlântica and INPE (2010). *Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica Período 2008-2010*. São Paulo, SP.

- Gall, Line Le and Saunders, G. W. (2010). Dna barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: A case study of the phylloporaceae (gigartinales, rhodophyta) in the canadian flora. *Journal of Phycology* 46(2), 374–389.
- Gerber, A. S., R. Loggins, S. Kumar, and T. E. Dowling (2001). Does nonneutral evolution shape observed patterns of dna variation in animal mitochondrial genomes? *Annual Review of Genetics* 35, 539–566.
- Gilpin, M. and M. Soulé. (1986). Minimum viable populations: processes of extinction. In M. Soulé (Ed.), *Conservation biology: The science of scarcity and diversity*, pp. 19–34. Sunderland: Sinauer Associates.
- Gomulkiewicz, R. and R. D. Holt (1995). When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution* 49(1), 201–207.
- Gonzaga, M. O. (2007). *Sociedade e cuidado parental*, pp. 185–208. Editora Interciência.
- Goudet, J. (1995). FSTAT version 1.2: a computer program to calculate f-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485–486.
- Greenstone, M. H. (1982). Ballooning frequency and habitat predictability in two wolf spiders (lycosidae: Pardosa). *Can. Entomol* 65, 84–89.
- Groeneveld, J., L. Alves, L. Bernacci, E. Catharino, C. Knogge, J. Metzger, S. Pütz, and A. Huth (2009). The impact of fragmentation and density regulation on forest succession in the atlantic rain forest. *Ecol. Modell.* 220(19), 2450–2459.
- Haag, T., A. S. Santos, D. A. Sana, R. G. Morato, L. Cullen Jr, P. G. Crawshaw Jr, C. De Angelo, M. S. Di Bitetti, F. M. Salzano, and E. Eizirik (2010). The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of atlantic forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology* 19, 4906–4921.
- Hafernik, J. E. J. (1992). *Threats to invertebrate biodiversity: implications for conservation strategies*, pp. 171–195. New York and London: Chapman and Hall.
- Hamrick, J. L. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management* 197(1-3), 323–335.
- Hanski, I. and M. E. Gilpin (1991). Metapopulation dynamics: Brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society* 42, 3–16.
- Hasegawa, M., H. Kishino, and T. aki Yano (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial dna. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160–174.
- Hayden, M. J. and P. J. Sharp (2001). Targeted development of informative microsatellite (ssr) markers. *Nucleic Acids Research* 29(8), 1–6.

- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, and J. R. deWaard (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, S96–S99.
- Hedin, M. C. and W. P. A. Maddison (2001). Combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily dendryphantinae (araneae: Salticidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 386–403.
- Hofer, H. (1990). The spider community (araneae) of a central amazonian blackwater inundation forest (igapo). *Acta Zoologica Fennica* 190, 173–179.
- IBGE, F. (1992). *Manual Técnico da Vegetação Brasileira (Manuais Técnicos de Geociências nº01)*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Instituto Serra do Japi (1998). *O Patrimônio Natural Serra do Japi - Riscos e Ações para Preservação. Literarte*.
- Izidoro, T. F. and K. Del-Claro (2005). Influência de fatores ambientais na reprodução de *Aglaoctenus lagotis*, homberg 1876 (araneae, lycosidae) em perdizes, mg, brasil. In *Actas do Primer Congreso Latino Americano de Aracnología*, Volume 1, pp. 112.
- Johannesen, J., A. Kiefer, M. Veith, and J. Kral (2005). Genetic cohesion of *Eresus walckenaeri* (araneae, eresidae) in the eastern mediterranean. *Biological Journal of the Linnean Society* 86, 1–9.
- Johannesen, J. and Y. Lubin (2001). Evidence for kin-structured group founding and limited juvenile dispersal in the sub-social spider *Stegodyphus lineatus* (eresidae). *Journal of Arachnology* 29, 413–422.
- Johannesen, J., Y. Lubin, D. R. Smith, T. Bilde, and J. M. Schneider (2007). The age and evolution of sociality in *Stegodyphus* spiders: a molecular phylogenetic perspective. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 231–237.
- Joly, C. A. (1992). *Preservação da Serra do Japi*, pp. 310–321. Campinas: Unicamp/FAPESP.
- Jung, Sunghoon and Duwal, R. K. and S. Lee (2011). COI barcoding of true bugs (insecta, heteroptera). *Molecular Ecology Resources* 11(2), 266–270.
- Kerr, K. C. R. (2010). A cryptic, intergeneric cytochrome c oxidase I pseudogene in tyrant flycatchers (family: Tyrannidae). *Genome* 53(12), 1103–1109.
- Koutroumpa, F. A., F. Lieutier, and G. Roux-Morabito (2009). Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome (numts) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (coleoptera, cerambycidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47, 141–148.
- Krauss, S. (1994). Restricted gene flow within the morphologically complex species *persoonia mollis* (proteaceae): contrasting evidence from the mating system and pollen dispersal. *Heredity* 73, 142–154.

- Lande, R. and S. Shannon (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *evolution* 50(1), 434–437.
- Laurance, W., P. Delamonica, S. Laurance, H. Vasconcelos, and T. Lovejoy (2000). Rainforest fragmentation kills big trees. *Nature* 404, 836.
- Laurance, W. F. (2009). Conserving the hottest of the hotspots. *Biological Conservation* 142, 1137.
- Laurance, W. F. and Bierregaard Jr (1997). *Tropical Forest Remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*. Chicago: Chicago University Press.
- Laurance, W. F., H. E. M. Nascimento, S. G. Laurance, A. Andrade, J. E. L. S. Ribeiro, J. P. Giraldo, T. E. Lovejoy, R. Condit, J. Chave, K. E. Harms, and S. D'Angelo (2006). Rapid decay of tree-community composition in amazonian forest fragments. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(50), 19010–19014.
- Leite, E. C. (2000). *A vegetação de uma Reserva Biológica Municipal: contribuição ao manejo e a conservação da Serra do Japi, Jundiaí, SP*. Ph. D. thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Lindenmayer, D. B. and J. Fischer (2006). *Habitat fragmentation and landscape change*. Washington D.C.: Island Press.
- Lubin, Yand Birkhofer, K., R. Berger-Tal, and T. Bilde (2009). Limited male dispersal in a social spider with extreme inbreeding. *Biological Journal of the Linnean Society* 97, 227–234.
- Mantel, N. (1967). Detection of a disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209–220.
- Mantel, N. and R. S. Valand (1970). A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* 26, 547–558.
- Marshall, S. D., S. E. Walker, and A. L. Rypstra (2006). Two ecologically-divergent generalist predators have different responses to landscape fragmentation. *Oikos* 114(2), 241–248.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk, and J. M. Pemberton (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639–655.
- McCouch, S. R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and M. Blair (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35, 89–99.
- Melo, L. R. (2006). Efeito de borda sobre a dinâmica e estrutura das comunidades de árvores na mata atlântica da reserva biológica do tinguá-rj. rio de janeiro. Monografia.
- Metzger, J. P. (2009). Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic atlantic forest region. *Biological Conservation* 142, 1166–1177.

- Morellato, L. P. C. (1992). *História natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. Campinas: Editora Unicamp.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, and J. Kent (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Pamilo, P., L. Viljakainen, and A. Vihavainen (2007). Exceptionally high density of numts in the honeybee genome. *Mol Biol Evol* 24, 1340–1346.
- Pavesi, L., E. D. Matthaeis, R. Tiedemann, and V. Ketmaier (2011). Temporal population genetics and coi phylogeography of the *Sandhopper Macarorchestia remyi* (amphipoda: Talitridae). *Zoological Studies* 50(2), 220–229.
- Pellegrino, A. C., V. M. Capovilla, and V.-N. J (2005). Padrões de distribuição espacial de *Aglaoctenus lagotis* (araneae, lycosidae) em relação à abundância de alimento. In Primer Congreso Latinoamericano de Aracnología & V Encuentro de Aracnólogos del Cono Sur (Ed.), *Actas del Primer Congreso Latinoamericano de Aracnología & V Encuentro de Aracnólogos del Cono Sur*, Volume 13, pp. 139. Minas, Lavallejas, Uruguai.
- Platnick (1995). An abundance of spiders. *Natural History* 52.
- Platnick, N. I. (2011). The world spider catalog. research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
- Posada, D. and K. A. Crandall (1998). Modeltest: testing the model of dna substitution. *Bioinformatics* 14(9), 817–818.
- Posada, D., K. A. Crandall, and A. R. Templeton (2000). GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9, 487–488.
- Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G. G. Vendramin, and J. A. Rafalski (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92, 7759–7763.
- Prieto-Benítez, S. and M. Méndez (2011). Effects of land management on the abundance and richness of spiders (araneae): A meta-analysis. *Biological Conservation* 144, 683–691.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly (2000). Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Pütz, S., J. Groeneveld, L. F. Alves, J. P. Metzger, and A. Huth. (2011). Fragmentation drives tropical forest fragments to early successional states: a modelling study for brazilian atlantic forests. *Ecological Modelling* 222, 1986–1997.
- Rajora, O. P., M. H. Rahman, G. P. Biuchert, and B. P. Dancik (2000). Microsatellite dna analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white p: (*pinus strobus*) in ontario, vancouver. *Molecular Ecology* 9, 339–348.

- Ramirez, M. G. and L. B. Fandino (1996). Genetic variability and gene flow in *metepeira ventura* (araneae, araneidae). *Journal of Arachnology* 24, 1–8.
- Ramirez, M. G. and K. E. Haakonsen (1999). Gene flow among habitat patches on a fragmented landscape in the spider *argiope trifasciata* (araneae: Araneidae). *Heredity* 83, 580–585.
- Raymond, M. and F. Rousset (1995). GENEPOP (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Reed, D. H. and R. Frankham (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1), 230–237.
- Reed, D. H., A. C. Nicholas, and G. E. Stratton (2007). Inbreeding levels and prey abundance interact to determine fecundity in natural populations of two species of wolf spider. *Conservation Genetics* 8(5), 1061–1071.
- Reed, D. H., V.-H. Teoh, G. E. Stratton, and R. A. Hataway (2011). Levels of gene flow among populations of a wolf spider in a recently fragmented habitat: current versus historical rates. *Conservation Genetics* 12, 331–335.
- Rego, F. N. A. A., E. M. Venticinque, and A. D. Brescovit (2007, august). Effects of forest fragmentation on four ctenus spider populations (araneae: Ctenidae) in central amazonia, brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 42(2), 137–144.
- Ribeiro, M. C., J. P. Metzger, A. C. Martensen, F. J. Ponzoni, and M. M. Hirota (2009). The brazilian atlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? implications for conservation. *Biological Conservation* 142, 1141–1153.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Richly, E. and D. Leister (2004). NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol* 21(6), 1081–1084.
- Robinson, E. A., G. A. Blagoev, P. D. N. Hebert, and S. J. Adamowicz (2009). Prospects for using dna barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys* 16, 27–46.
- Rock, J., F. O. Costa, D. I. Walker, A. W. North, W. F. Hutchinson, and G. R. Carvalho (2008). DNA barcodes of fish of the scotia sea, antarctica, indicate priority groups for taxonomic and systematics. *Antartic Science* 20, 253–262.
- Rodrigues, R. R., C. A. Joly, M. C. W. Brito, A. Paese, J. P. Metzger, L. Casatti, M. A. Nalon, N. Menezes, N. M. Ivanauska, V. Bolzani, and V. L. R. Bononi (2008). *Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo*. São Paulo.
- Rubio, G. D. and E. I. Torres (2003). Presencia de *aglaoctenus lagotis* holmberg (araneae: Lycosidae) en dos especies de bromeliáceas de la provincia de corrientes (argentina). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas B-038*.

- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius, and I. Hanski (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491–494.
- Samu, F., K. D. Sunderland, and C. Szinnetar (1999). Scale-dependent dispersal and distribution patterns of spiders in agricultural systems: a review. *Journal of Arachnology* 27, 325–332.
- Santin, D. A. (1999). *A vegetação remanescente do município de Campinas (SP): Mapeamento, caracterização fisionômica e florística, visando a conservação*. Ph. D. thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Santos, A. J. and A. D. Brescovit (2001). A revision of the south american spider genus *aglaotenus* tullgren, 1905 (araneae, lycosidae, sosippinae). *Andrias* 15, 75–90.
- Scarano, F. R. (2002). Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the brazilian atlantic rain forest. *Annals of Botany* 90, 517–524.
- Schmitt, T. and A. Seitz (2002). Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *polyommatus coridon* (lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. *Biological Conservation* 107, 291–297.
- Schneider, J. M., J. Roos, Y. Lubin, and J. R. Henschel (2001). Dispersal of *stegodyphus dumicola* (araneae, eresidae): They do balloon after all! *Journal of Arachnology* 29, 114–116.
- Schwarcz, K. D., C. L. Pataca, A. G. Abreu, J. M. Bariani, C. M. T. Macrini, and V. N. Solferini (2010). Fragmentation effect on *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) and *Metrodorea nigra* A. St-Hil. (Rutaceae): Two species with distinct seed dispersion strategies. *Botanical Journal of Linnean Society* 164, 326–336.
- Seifert, K. A., R. M. Samson, J. R. deWaard, J. Houbaken, C. A. Lévesque, G. L. S. Moncalvo, and P. D. N. Hebert (2007). prospects for fungus identification using coi dna barcodes, with penicillium as a test case. *Proceeding of National Academy of Sciences of USA* 104, 3901–3906.
- Shaw, P. W., G. J. Pierce, and P. R. Boyle (1999). Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite dna markers. *Molecular Ecology* 8, 407–417.
- Shear, W. A., J. M. Palmer, J. A. Coddington, and P. M. Bonamo (1989). A devonian spinneret: early evidence of spiders and silk use. *Science* 246, 479–481.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651–701.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39, 53–65.
- Smith, D., S. Van Rijn, J. Henschel, T. Bilde, and Y. Lubin (2009). Amplified fragment length polymorphism fingerprints support limited gene flow among social spider populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 97, 235–246.

- Smith, M. A., J. N. A. Poyarkov, and P. D. N. Hebert (2008). COI DNA barcoding amphibians: Take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources* 8, 235–246.
- Solorzano, C. D., A. L. Szalanski, M. Kence, J. A. McKern, J. W. Austin, and A. Kence (2009). Phylogeography and population genetics of honey bees (*apis mellifera*) from turkey based on coi-coii sequence data. *Sociobiology* 53(1).
- Song, H., J. E. Buhay, M. F. Whiting, and K. A. Crandall (2008). Many species in one: Dna barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13486–13491.
- Sordi, S. J. (1996). Ecologia de populações de aranha *porrimosa lagotis* (lycosidade) nas reservas Mata de Santa Genebra, Campinas (SP) e Serra do Japi, Jundiá (SP). Master's thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Souza, A. L. T. (2007). *Influência da estrutura do habitat na abundância e diversidade de aranhas*, pp. 25–43. Rio de Janeiro: Editora Interciencia.
- Spielman, D., B. W. Brook, and R. Frankham (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(42), 15261–15264.
- Suganuma, E. and A. Y. Ciampi (2001). Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp. *Leguminosae*) utilizando microssatélites. Technical report, Embrapa/Cenargen.
- Tabarelli, M., L. P. Pinto, J. M. C. Silva, M. Hirota, and L. Bede (2005). Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the brazilian atlantic forest. *Conservation Biology* 19, 695–700.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar (2007). Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Templeton, A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7, 381–397.
- Templeton, A. R. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10, 779–791.
- Templeton, A. R., E. Routman, and C. A. Phillips (1995). Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial dna haplotypes in the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* (140), 767–782.
- Turnbull, A. (1973). Ecology of the true spiders (araneomorphae). *Annual Review of Entomology* 18, 305–348.
- van Dongen, S., T. Backeljau, E. Matthysen, and A. A. Dhondt (1998). Genetic population structure of the winter moth (*Operophtera brumata* L.) (lepidoptera, geometridae) in a fragmented landscape. *Heredity* 80, 92–100.

- Vanderghost, A. G., R. G. Gillespie, and G. K. Roderick (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.
- Watling, J. I. and M. A. Donnelly (2006). Fragments as islands: a synthesis of faunal responses to habitat patchiness. *Conservation Biology* 20, 1016–1025.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham (1984). Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6), 1358–1370.
- Whitmore, T. and J. Sayer (1992). *Deforestation and species extinction in tropical moist forests*, pp. 1–14. Chapman & Hall.
- With, K. and A. King (1999). Dispersal success on fractal landscapes: a consequence of lacunarity thresholds. *Landscape Ecology* 14.
- Young, A., T. Boyle, and T. Brown (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10), 413–418.
- Yu, L. L., Y. K. Xiao, N. Y. Zi, K. Jie, M. Shen, and M. C. Li (2009). Genetic diversity and historical demography of chinese shrimp feneropenaeus chinensis in yellow sea and bohai sea based on mitochondrial dna analysis. *African Journal of Biotechnology* 8, 1193–1202.
- Zhang, D. X. and G. M. Hewitt (1996). Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial dna markers. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 247–251.
- Zwickl, D. J. (2006). *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion*. Ph. D. thesis, The University of Texas, Austin.

Anexos

Anexo 1: Estatísticas F da população total, sem os alelos Ala4 e Ala5. F_{IS} , coeficiente de endogamia, F_{IT} coeficiente de endogamia total e F_{ST} índice de fixação. O intervalo de confiança de 95%, entre parênteses, foi determinado por Bootstrapping.

F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
0,511 (0,422- 0,611)	0,658 (0,552- 0,752)	0,300 (0,180-0,391)

Anexo 2: Estimativa das frequências de alelos nulos por loco e população.

Loco	JAPI1	JAPI2	RC	ANT	VAL
Ala1	0,026	0,226*	0,240*	0,000	0,001
Ala2	0,206*	0,167*	0,133*	0,061*	0,236*
Ala3	0,250*	0,318*	0,322*	0,161*	0,084*
Ala4	0,019	0,310*	-	-	0,000
Ala5	0,167*	0,000	-	-	0,001
Ala6	0,151*	0,221*	0,170*	0,110*	0,130*
Ala7	0,001	0,217*	0,338*	0,388*	0,232*
Ala8	0,001	0,000	0,183*	0,155*	0,205*

(*) valores significativos.

Anexo 3: Teste exato de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weiberg por loco e população.

Loco	JAPI1	JAPI2	RC	ANT	VAL
Ala1	0,224	0,004*	0,000*	1,000	1,000
Ala2	0,000*	0,032**	0,032*	0,163	0,077
Ala3	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,034**
Ala4	0,229	0,003*	-	-	0,458
Ala5	0,000*	1,000	-	-	1,000
Ala6	0,001*	0,001*	0,030**	0,115	0,089
Ala7	1,000	0,001*	0,000*	0,000*	0,000*
Ala8	1,000	1,000	0,006*	0,004*	0,001*

(*) valores de p-value significativos;

(**) valores de p-value não significativos
após correção de bonferroni

Anexo 4: Intervalo de confiança de 95% determinado por *bootstrapping* para valores de F_{ST} par a par das populações de *Aglaoctenus lagotis*. Dados de microsátélites.

	JAPI1	JAPI2	RC	ANT
JAPI2	0,058-0,180			
RC	0,068-0,297	0,027-0,206		
ANT	0,276-0,584	0,193-0,417	0,112-0,308	
VAL	0,386-0,606	0,288-0,562	0,220-0,435	0,072-0,241

Anexo 5: Intervalo de confiança de 95% determinado por *bootstrapping* para valores de F_{ST} par a par das populações estudadas de *Aglaoctenus lagotis* corrigidos para alelos nulos. Dados de microsátélites.

	JAPI1	JAPI2	RC	ANT
JAPI2	0,047-0,189			
RC	0,065-0,327	0,032-0,142		
ANT	0,246-0,599	0,172-0,414	0,091-0,325	
VAL	0,370-0,613	0,262-0,563	0,168-0,445	0,040-0,223

Anexo 6: Matriz de distância geográfica entre populações de *Aglaoctenus lagotis*.

	JAPI1	JAPI2	RC	ANT
JAPI2	2075,31			
RC	45064,08	45090,87		
ANT	47046,75	47067,33	2575,27	
VAL	26372,00	26375,80	19246,58	20957,54

Anezo 7: Intervalo de confiança de 95% determinado por *bootstrapping* para valores de F_{ST} par a par das populações do Grupo A de *Aglaotenus lagotis*. Dados de microsátélites.

	JAP2a	RCA
RCA	0,062- 0,271	
JAPI1	0,018- 0,197	0,036- 0,276
ANT	0,278-0,564	0,202-0,484
VAL	0,352-0,677	0,307-0,589

Anezo 8: Intervalo de confiança de 95% determinado por *bootstrapping* para valores de F_{ST} par a par das populações do Grupo A de *Aglaotenus lagotis* corrigido para alelos nulos. Dados de microsátélites.

	JAP2a	RCA
RCA	0,091- 0,233	
JAPI1	0,019-0,180	0,022- 0,231
ANT	0,254-0,579	0,182-0,491
VAL	0,337-0,676	0,255-0,598

Anezo 9: Valores de F_{IS} por loco nos Grupos A e B.

Loco/ F_{IS}	Grupo A	Grupo B
Ala 1	382	-42
Ala2	456	516
Ala3	748	500
Ala4	198	279
Ala5	415	500
Ala6	456	469
Ala7	1000	722
Ala8	1000	480

Anexo 10: Frequência haplotípica das populações de *Aglaoctenus lagotis*. Em verde estão os haplótipos e populações pertencentes ao Grupo A e em vermelho os pertencentes ao Grupo B.

Haplótipo	Japi1	Japi2	Japi2A	Japi2B	RC	RCA	RCB	ANT	VAL
1	0,900	0,000	0,000	0,000	0,111	0,250	0,000	0,000	0,000
2	0,100	0,500	0,800	0,000	0,333	0,750	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,125	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,375	0,000	1,000	0,333	0,000	0,600	0,700	0,857
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,222	0,000	0,400	0,300	0,000

Apêndice

Artigo aceito para publicação no periódico *Molecular Ecology Resources* (ISSN: 1755-0998) em outubro de 2011.

Isolation and characterization of 8 microsatellite loci in *Aglaoctenus lagotis*
(Araneae, Lycosidae)¹

Camila M. T. Macrini², Kaiser D. Schwarcz^{2,3}, Aluana G. Abreu³ and Vera N.
Solferini^{2,4}.

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade de Campinas, Cidade
Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13083-97.

³APTA Pólo Centro-Sul, Rodovia SP 127, km 30, CP 28, Piracicaba, SP, Brazil, 13400-
970

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

⁴Author for correspondence

Author's correspondence respectively:

camilamacrini@gmail.com

schwarcz.kaiser@gmail.com

agabreu@gmail.com

solferin@unicamp.br

This research was supported by the Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo
(grants 06/55840-0).

Abstract

We report 8 new polymorphic microsatellite markers for the South American wolf spider *Aglaoctenus lagotis*. Diversity ranged from four to twelve alleles with an average of 7.4 alleles per locus. The mean observed and expected heterozygosity (H_O and H_E) were 0.388 and 0.609 respectively. Four loci deviated significantly from Hardy–Weinberg equilibrium and no evidence of linkage disequilibrium was found. Consequently these newly isolated markers are excellent tools to study the population structure and genetic diversity of *A. lagotis*.

Keywords: Wolf spider, Atlantic Forest, Conservation Genetics, Population Genetics, and SSR.

Introduction

The wolf spider *Aglaoctenus lagotis* occurs in South America, in primary and disturbed patches of Atlantic Forest (Santos and Brescovit 2001). Their webs are funnel-shaped silk tubes that are built in humid and shadowed microhabitats (Rubio and Torres 2003). Females of *A. lagotis* present maternal care behavior, unusual in spiders, which contributes to juvenile aggregation (Gonzaga 2007). Specific microenvironment requirements, together with juvenile late dispersion, suggest that this species may have strong population genetic structure. Furthermore, Atlantic Forest depletion to less than 10% of the original area may have influenced this species population dynamics (Scarano 2002 and Schwarcz 2010). Habitat loss could have increased aggregation in this species as optimal microhabitats became less abundant. In addition, dispersion among populations may be reduced in a fragmented landscape increasing endogamy and the influence of stochastic factors. In order to investigate *A. lagotis* population structure within Atlantic Forest we isolated and characterized 8 nuclear microsatellite loci.

Materials and Methods

Genomic DNA was extracted using *Wizard* DNA Purification Kit (Promega). DNA was digested using the restriction enzyme *Rsa* I (Invitrogen). The resulting fragments were ligated into biotin-labelled oligonucleotide sequences. Fragments were hybridized to 5' biotin-labelled oligonucleotide probes (biotin-(GT)₈ and biotin-(CT)₈)

1 after denaturation. The hybrids were bound to streptavidin coated magnetic beads,
2 described by Kijas *et al.* (1994) with modifications by Billote *et al.* (1999). These
3 microsatellite-enriched fragments were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega) as
4 described by the supplier, and used to transform XL1-Blue competent cells (*Escherichia*
5 *coli*, Stratagene). The inserts of 96 recombinant colonies were sequenced using M13
6 primers on the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied
7 Biosystems) and ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). The quality
8 of the sequences was confirmed using Chromas Lite v2.0
9 (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>). Polymerase chain reaction
10 (PCR) primer pairs were designed using Primer3 software 0.4.0 (Rozen and Skaletsky
11 2000).

12 All PCR amplifications were carried out in a Veriti 96-Well Thermal Cycler
13 (Applied Biosystems) under the following conditions: 3 min at 94 °C, then 25-30 cycles
14 of 30s at 94 °C, 30s at the appropriate annealing temperature (Table 1), and 45s at 72
15 °C, followed by 10 min at 72 °C. A total reaction volume of 10 µL was used, containing
16 20 ng of DNA, 0.5 µm of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1X PCR Buffer (Fermentas),
17 18-3.0 mM MgCl₂ (Table 1), 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (Fermentas).

18 To assess the genetic diversity with microsatellite markers, 10 individuals of *A.*
19 *lagotis* from three locations (a total of 30 individuals) were analysed: Vinhedo
20 (23°00'05"S, 46°57'59"W) in Valinhos; Ribeirão Cachoeira (22°49'56"S, 46°55'40"W)
21 in Campinas, and Serra do Japi (23°14'14"S, 46°56'24"W) in Jundiaí, all of which are
22 located in São Paulo State, Brazil. The PCR products were electrophoresed in 7%
23 polyacrylamide gels and the DNA bands were visualized by silver staining (Sanguinetti
24 *et al.* 1994). Genotypes were determined in relation to a 10bp DNA size standard
25 (Invitrogen).

26 The allelic richness (A), the observed and expected heterozygosities (H_O and H_E)
27 were estimated using GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Hardy–Weinberg
28 equilibrium (Fisher's exact test) and linkage disequilibrium (Fisher's exact test) within
29 the populations were tested with software GENEPOP version 3.4 (Raymond and
30 Rousset 1995). Both tests were corrected for multiple comparisons by a sequential
31 Bonferroni correction (Rice 1989). The estimated null allele frequencies were calculated
32 using Cervus version 2.0 (Marshall *et al.* 1998).

33
34

Results and Discussion

From the library, 96 clones were sequenced, 27 SSRs contained motifs longer than ten repeats, were found: 18.5% mononucleotides, 33.4% dinucleotides and 48.1% compounds. Of these sequences, 17 had a flanking region of adequate size for the design of forward and reverse primers. In total 8 (Table 1) of the 17 designed primers successfully amplified and were used to characterize individuals from the three populations.

The number of alleles observed at each locus ranged from 4 to 12 with an average of 7.4 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0.182 to 0.600 (mean = 0.388) and the expected heterozygosity ranged from 0.382 to 0.809 (mean = 0.609) (Table 1). Exact tests indicated that four loci (B05, FO1, GO2 and G08) deviated significantly from Hardy–Weinberg equilibrium (Table 1). This deviation could be explained by Wahlund effect due to sampling geographically differentiated genetic pools and/or null alleles. Null alleles were present in all loci with frequencies ranging from 0.055 to 0.472. High levels of homozygosity were also found in other species of wolf spider using microsatellites (Hataway et al. 2010, and Reed et al. 2011). Endogamy and habitat loss were cited as possible reasons which are consistent with the late juvenile dispersion of *A. lagotis* and the Atlantic Forest fragmentation. We did not detect significant linkage disequilibrium between loci in any population after Bonferroni corrections.

Although Atlantic Forest is a conservation hotspot (Myers et al. 2000), the genetic structure of native species has been poorly studied. The isolation and characterization of these 8 loci will be useful to study the genetic diversity of *Aglaoctenus lagotis* in Atlantic Forest. Furthermore, this novel set of primers will enable us to measure gene flow between patches and to idealize a theoretical model of genetic consequences of fragmentation in this endangered ecosystem.

Acknowledgments

We thank Anete P. Souza, Melissa Santos and Prianda Laborda for the technical support. Elen Peres, Marcelo Gonzaga e Adalberto Santos for the help in the field expeditions and material collect.

References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). Available online: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm/>
- Billote N, Risterucci AM, Baurens FC. 1999. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- Gonzaga MO. 2007. Sociedade e cuidado parental. In: Gonzaga MO, Santos AJ, Japyassú H.F, editors. *Ecologia e Comportamento de Aranhas*, pp. 185-208. Editora interciência.
- Hataway RA, Reed DH, Noonan B P. 2011. Development of 10 microsatellite loci in the Wolf Spider *Arctosa sancterosae* (Araneae: Lycosidae). *Conservation Genetics* 3: 271-273.
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA, Thomas M. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16: 656–660.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk L, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639–655.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248–249
- Reed DH, Teoh VH, Stratton GE, Hataway RA. 2011. Levels of gene flow among populations of a wolf spider in a recently fragmented habitat: current versus historical rates. *Conserv Genet* 12: 331–335.

- 1 Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225
- 2
- 3 Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3: Bioinformatics Methods and Protocols. In:
- 4 Krawetz S and Misener S, editors. *Methods in Molecular Biology*, pp. 365-386.
- 5 Humana Press. Available online: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3)
- 6 [bin/primer3/primer3](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3) www.cgi.
- 7
- 8 Rubio GD, Torres EI. 2003. Presencia de *Aglaoctenus lagotis* Holmberg (Araneae:
- 9 Lycosidae) en dos especies de Bromeliáceas de la provincia de Corrientes (Argentina).
- 10 *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* B-038. Available online:
- 11 <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/06-Biologicas/B-038.pdf>
- 12
- 13 Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG. 1994. Rapid silver staining and recovery of
- 14 PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.
- 15
- 16 Santos AJ, Brescovit AD. 2001. A revision of the South American spider genus
- 17 *Aglaoctenus* Tullgren, 1905 (Araneae, Lycosidae, Sosippinae). *Andrias* 15: 75-90.
- 18
- 19 Scarano FR. 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in
- 20 stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rain forest. *Ann Bot* 90: 517–524
- 21
- 22 Schwarcz KD, Pataca CL, Abreu AG, Bariani JM, Macrini CMT, Solferini VN. 2010.
- 23 Genetic diversity in Atlantic Forest trees: fragmentation effects on *Astronium*
- 24 *graveolens* (Anacardiaceae) and *Metrodorea nigra* (Rutaceae), species with distinct
- 25 seed dispersal strategies. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 326–336.

26

27

Table 1 Characteristics of 8 nuclear microsatellite loci developed for *Aglaoctenus lagotis*: F, Forward primer sequence; R, reverse primer sequence; TA (°C), annealing temperature; A, number of alleles; MgCl₂, MgCl₂ concentration used in mM; Range, amplicon size in base pairs; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; GB n°, the GenBank accession number.

Loci name	Primer sequences (5'–3')	Repeat motif	TA (°C)	A	MgCl ₂ (mM)	Range (bp)	H _O	H _E	GB n°
Ala1	F: GCTGAGTCAACCTCTCAAA R: TGTGTTCAATCACCAACAA	(CA) ₅ TA(CA) ₁₂	56	7	1.8	245-280	0.600	0.687	JF436856
Ala2	F: AGGGCAGCCTGTGTATAAT R: CGGTGTAAATTGGTAAGG	(CT) ₉ (GT) ₇	61	6	2.5	212-238	0.219	0.512	JF436857
Ala 3	F: GCATGATGACAACCACAAT R: TAGTTTAACTCGGCCTCCT	(TA) ₅ TGTA (TG) ₉	50	9	3.0	215-300	0.308*	0.382	JF436858
Ala4	F: TTTATCTGGGTCGTGCTTT R: AAGATGCCTAGGAAGGTCA	(TC) ₁₈ (AC) ₇	50	10	3.0	175-248	0.563*	0.621	JF436859
Ala 5	F: CATTGTCCACTCACGAAG R: TCTCCGTTCTGATCTGATTT	(TG) ₁₁	52	12	3.0	270-370	0.500	0.809	JF436860
Ala 6	F: TTTATCTGGGTCGTGCTTT R: AAGATGCCTAGGAAGGTCA	(TC) ₂₀ (AC) ₆	51	6	3.0	170-190	0.400*	0.632	JF436861
Ala 7	F: AACTTAACTTCAGTGTCTG R: ATCAATTCCCATGTGATCC	(CA) ₁₂	50	5	2.8	205-240	0.333	0.730	JF436862
Ala 8	F: TCACTCGACATGAGTCCAC R: ACAACATTTAGCACAGCAT	(TG) ₁₂	56	4	2.4	222-232	0.182*	0.502	JF436863

* Locus significantly deviates from Hardy–Weinberg expectations after Bonferroni correction.