

Luiz Filipe de Macedo Bartoleti

**“Variabilidade genética e filogeografia
de *Nephila clavipes* (Araneae:
Nephilidae)”**

Campinas
2013



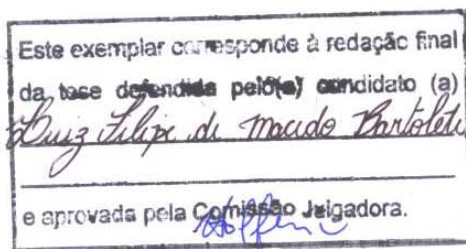
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIZ FILIPE DE MACEDO BARTOLETI

**“VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DE *Nephila*
Clavipes (ARANEAE: NEPHILIDAE)”**

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



Orientadora: Profa. Dra. VERA NISAKA SOLFERINI

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B285v Bartoleti, Luiz Filipe de Macedo, 1988-
Variabilidade genética e filogeografia de *Nephila*
clavipes (Araneae: Nephilidae) / Luiz Filipe de Macedo
Bartoletti. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Filogeografia. 2. Fragmentação florestal. 3.
Nephila. 4. Mata Atlântica. 5. Fluxo gênico. I.
Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Genetic variability and phylogeography of *Nephila clavipes*
(Araneae: Nephilidae)

Palavras-chave em Inglês:

Phylogeography

Forest fragmentation

Nephila

Brazilian Atlantic Rainforest

Gene flow

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Louis Bernard Klaczko

Karla Suemy Clemente Yotoko

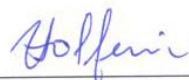
Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 19 de fevereiro de 2013

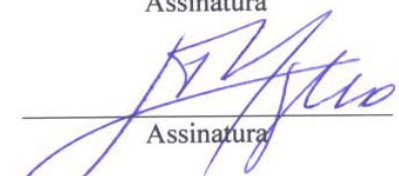
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini (orientadora)



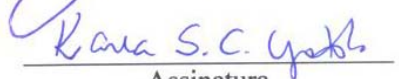
Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Assinatura

Profa. Dra. Karla Suemy Clemente Yotoko



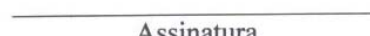
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin



Assinatura

Prof. Dr. Reinaldo Otavio Alvarenga Alves de Brito



Assinatura

Agradecimentos

Quando olho para trás, sempre tenho a impressão de que aprendi a viver um pouco mais tarde do que deveria. Passei boa parte da minha vida ali, existindo, evitando criar laços, não estabelecendo vínculos. Vivia meio que no piloto automático. Não que a vida fosse chata; querendo ou não, o piloto automático de uma criança passa do “brincar” pro “comer”, e quando não dá mais conta de repetir os dois, “dormir”. E estudar. Caramba, como eu gostava de estudar.

Acho que é dessa época a que tenho mais lembranças de me sentir parte de uma família. Com pais juntos ou não, minha infância guarda a maior parte das boas memórias que tenho deles. Lembro de querer esperar meu pai chegar do trabalho a noite, mas acabar dormindo. Lembro da primeira noite no apartamento recém comprado, dormindo sobre o colchão na sala com minha mãe e meu irmão. Lembro de festas, natais, aniversários, primos, tios, padrinhos, avós. Essas lembranças que você só sabe aproveitar de verdade quando é criança.

Crescer foi complicado, como é pra todo mundo. Aos poucos, o piloto automático foi ficando de lado. Fui percebendo que as pessoas existem para que você se apegue a elas; para que elas, de alguma forma, façam parte de você. Talvez sejam dessa fase os amigos mais antigos que eu cultivo até hoje. Meus poucos amigos de Jundiaí, desde 2003 até o fim do mundo fazendo parte de mim. Crescendo, mudando, se transformando, mas, ainda assim, meus amigos.

Me faltam palavras para começar a escrever sobre o que foi estar na UNICAMP. Esse lugar não foi apenas o que recebeu uma criança e transformou num cientista; que me ensinou o que é senso crítico, o que é responsabilidade na formação de pessoas, o que é saber dar a minha opinião sem impô-la; que me ensinou que a dúvida constante é a melhor qualidade de um cientista. O lugar que me transformou como pessoa. Me fez mais tolerante, mais comunicativo, mais compreensivo; me ensinou a lidar melhor com as diferenças, a aceitar as pessoas do jeito que elas são. Me despiu de preconceitos e, na medida do possível, me tornou uma pessoa melhor. Foi aqui (e digo aqui literalmente, pois cá estou eu em pleno dezenove de dezembro, sem conseguir sair de Campinas) que passei, indiscutivelmente, os melhores momentos da minha vida (até agora!). Foi aqui que conheci tanta gente incrível que poderia falar horas sobre elas. Foi aqui que pessoas me conquistaram e foram conquistadas. Foi aqui que eu fiz os melhores amigos que um dia eu podia ter sonhado em ter. E são esses amigos que eu espero, e digo isso de todo o coração, que estejam na minha vida para sempre. Que a distância não nos impeça de expressar o quanto gostamos, o quanto sentimos falta, o quanto essas pessoas nos fazem melhores.

Quanto aos agradecimentos...

Primeiramente, gostaria de agradecer à Vera, sobretudo, pela confiança depositada em mim. Já são cinco anos de laboratório e eu sinto que, finalmente, eu aproveito esse lugar tanto quanto deveria. Muito obrigado por todos os ensinamentos, pelas dicas, conselhos, pela orientação nesse Mestrado. E, principalmente, pela confiança nas duas monitorias, que me

fizeram lembrar que o dom de transmitir conhecimento é precioso e precisa ser constantemente aperfeiçoado.

Aos membros da banca: Karla, por ter sido sempre solícita e ter arranjado um espaço para fazer parte desta Defesa. Por ter recebido a mim e à Elen na sua casa quando fomos coletar em Viçosa. Essas coletas em Minas Gerais foram essenciais para deixar nossos resultados ainda mais interessantes. Pela ajuda e pela disposição. Ao professor Louis Bernard por ser, sem sombra de dúvida, um dos melhores professores com o qual tive a oportunidade de aprender. Obrigado por consolidar o pensamento evolutivo na minha cabeça. Pela risada tão engraçada, por ser sempre tão prestativo e disposto a ajudar.

À minha família, principalmente aos meus pais, Ademir e Sueli. Por terem me dado o suporte necessário para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Por não duvidarem de mim, por aceitarem minhas decisões, por me deixarem pensar por mim mesmo. Por serem tão devotos de seus filhos. Por terem contribuído para formar meu caráter, minha índole. Por serem dois dos maiores guerreiros que eu já conheci. Aos meus irmãos, Thiago e Vitor, por serem tão diferentes de mim e, por consequência, me fazerem tentar ser um pouco menos cabeça dura, menos marrento. Por me fazerem companhia há quase 25 (ou quase 9) anos. Aos avós, tios, primos, parentes em geral, em especial aos meus padrinhos Marcos e Eliane, por me apoiarem como a um filho.

Aos meus colegas de laboratório. Camila e Elen, por terem me ensinado tudo desde o início (até hoje!). Rafael, Thadeu, Fernanda, Jair, Maurício, Priscila, Mastronelli, Renê, Ju, João (os dois), Patrícia, Célia e todas as outras pessoas que passaram pelo LDG nesses cinco anos em que estive por aqui. Pela companhia, pela paciência e por terem me ensinado grande parte do que sei hoje. Ao Felipe, por ter confiado na minha orientação e por ter me dado um pequeno vislumbre do que é ser responsável pela formação científica de alguém.

A todos os amigos que me auxiliaram na realização das coletas, enfiando as cabeças em teias de aranhas. Aos colegas pesquisadores que me passaram informações muito úteis de locais de coleta, bem como me hospedaram ou auxiliaram das mais diversas maneiras.

Aos meus amigos de Jundiaí. Ana Paula, Camilla, Igor e Nathália, por mantermos uma amizade de quase dez anos. Por me conhecerem tão bem e ainda assim gostarem de mim. Por passarem por adolescência e vida adulta ao meu lado. Por estarem (quase) sempre disponíveis para nos encontrarmos nas raras oportunidades em que estamos todos na mesma cidade. Por compartilhar gostos, assuntos, ideias, ídolos, hobbies. Ou por ser o extremo oposto de tudo isso.

A todos os amigos do 06D, em especial Bigode, Bruna, Deivid, Gustavo, Henrique, Ju Bier, Lígia, Marcela, Nana, Patrick, Smith, Thaís Helena e Thaís Rirsch. Por terem passado toda essa experiência maluca comigo. Por, desde o começo, serem minha segunda família numa cidade nova. Por não terem deixado eu me sentir sozinho. Por serem tão leais, e por me darem certeza de que fiz a escolha certa, no momento certo.

A todas as pessoas com a qual tive o prazer de morar em Campinas. Bianca, Bixete, Bruna, Cuca, Deivid, Gabi, Gabriel, Heitor, Katrin, Laís, Lana, Lidianne, Maiona, Provs, Sid, Thaís Rirsch, Villa. Em especial à Reptospirose e agregados. Por propiciarem carinho e amizade especiais ao longo de tantos anos. Tantos momentos que foram especiais simplesmente por estar nessa casa com essas pessoas. Minha vida não seria a mesma sem vocês, e ela nunca mais será a mesma depois de vocês.

A todos os outros amigos que não foram citados aqui ainda, mas que tem a certeza do quanto me fazem bem e do quanto eu gosto de vocês. Tenho certeza que possuo uma parte de cada um, e espero ter deixado alguma coisa boa em cada um de vocês. Posso não demonstrar tudo isso claramente do jeito que gostaria, mas cada pessoa citada nesse texto, e todas as pessoas não citadas nas quais eu pensei enquanto escrevia, são essenciais e únicas para mim. E, espero que possa contar com a presença de todos vocês por muito mais tempo ainda na minha vida.

Ao Interbio, por me ensinar que a vida pode ser mais maluca do que se pensa, e isso não faz mal pra ninguém (só um pouco...).

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, ao Instituto de Biologia e à UNICAMP, por fazerem de mim o projeto de cientista que sou. Pela oportunidade de usufruir da valiosa infraestrutura por todos esses anos. A todos os professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram com a minha vida universitária.

A CAPES, à FAPESP e ao CNPQ, por proporcionarem os fundos necessários para que esse e outros projetos fossem realizados.

Obrigado!

“There is pleasure in the pathless woods,
There is rapture on the lonely shore,
There is society where none intrudes,
By the deep sea and the music in its roar;
I love not man the less, but Nature more.”

Lord Byron

“Two years he walks the earth. No phone, no pool, no pets, no cigarettes. Ultimate freedom. An extremist. An aesthetic voyager whose home is the road. Escaped from Atlanta. Thou shalt not return, 'cause "the West is the best." And now (...) comes the final and greatest adventure. The climactic battle to kill the false being within and victoriously conclude the spiritual pilgrimage. Ten days and nights of freight trains and hitchhiking bring him to the Great White North. No longer to be poisoned by civilization he flees, and walks alone upon the land to become lost in the wild.”

- Alexander Supertramp.
May 1992

“Science opens up new realms - from distant galaxies to subatomic particles, from rain forest canopies to the depths of the ocean - to feed the curiosity with which we are born. We gain new ways to appreciate things we may never have even considered before. The rocks exposed by road cuts were just barren ground until I studied geology, and the night sky became more enchanting simply by learning the names of a few stars and constellations. What I study becomes more beautiful as I learn more about it. I know other scientists have similar feelings.

Most fear is fear of the unknown; science replaces it with wonder.”

- Mark Isaak

Resumo

Processos históricos e contemporâneos moldaram os padrões de variabilidade genética das espécies da Mata Atlântica, um dos biomas mais diversos do mundo. Além disso, a fragmentação recente das florestas brasileiras pode causar sérios efeitos na estruturação genética das populações naturais, intensificando processos como deriva genética e endogamia. Os efeitos da fragmentação dependem principalmente da matriz entre os fragmentos e das características de dispersão da espécie. As aranhas são organismos que possuem modos de vida bastante diversos e as características de dispersão podem também variar bastante. *Nephila clavipes* é uma aranha que possui ampla distribuição na Mata Atlântica e considera-se que a espécie é capaz de dispersão por balonismo (dispersão aérea). Os objetivos desse trabalho foram estudar os padrões de variabilidade e estruturação genética em populações de fragmentos de Mata Atlântica, usando *N. clavipes*. Os estudos foram realizados em micro e macro escala, para inferir padrões de fluxo gênico e relacionar os resultados a aspectos ecológicos e comportamentais da espécie. Além disso, buscou-se explorar aspectos da história evolutiva da espécie e sua corrente distribuição em populações. Para isso, foi sequenciado o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I de 323 indivíduos coletados em 15 populações de cinco Estados. Foram calculados índices de diversidade genética, além de parâmetros filogeográficos, por meio de análises bayesianas e de máxima verossimilhança. Todas as populações apresentaram polimorfismo sendo que, em geral, as populações de Minas Gerais apresentaram índices de diversidade mais altos. Os valores médios de diversidade ficaram próximos aos encontrados para outras espécies do gênero. Foi encontrada grande estruturação genética, principalmente em distâncias médias e grandes, com F_{ST} geral de 0,30178. O F_{ST} no Estado de São Paulo (a microescala geográfica) foi de apenas 0,02996, indicando baixa estruturação em baixas distâncias. A distância genética não apresentou claras relações com a distância geográfica (Teste de Mantel, $p > 0,05$), o que pode ser devido à dispersão por agentes, inclusive antrópicos. A análise dos valores de F_{ST} obtidos apenas com as fêmeas indica que os machos podem ter efeito de manutenção do fluxo gênico em baixas distâncias. A rede de haplótipos e as árvores de máxima verossimilhança e bayesiana indicaram a presença de três clados genéticos, não inteiramente concordantes com a distribuição dos grupos geográficos. As estimativas apontam para divergências entre esses clados genéticos datadas do Pleistoceno, assim como reportado em vários outros organismos que habitam a Mata Atlântica. Nossos resultados mostram uma espécie de invertebrado apresentando padrões filogeográficos semelhantes aos encontrados para organismos de outros grupos, o que pode indicar processos em comum na diversificação das espécies da Mata Atlântica.

Abstract

Historic and contemporary processes have shaped the patterns of genetic variability of the species from Brazilian Atlantic Rainforest, one of the world's most diverse biomes. Furthermore, the recent fragmentation of Brazilian Rainforests may cause serious effects in genetic structure of natural populations, intensifying processes like genetic drift and endogamy. Fragmentation effects depend mainly on the matrix between the fragments and the species' dispersion characteristics. Spiders are organisms that show different lifestyles, and dispersion characteristics may also vary within the group. *Nephila clavipes* is a spider that is widely distributed in the Atlantic Rainforest and it is widely accepted that it is capable of ballooning (aerial dispersal). In the present work, we sought to study the patterns of genetic variability and structure in populations from fragments of Atlantic Rainforest, using *N. clavipes*. The studies have been made in micro and macro scale, looking forward to infer gene flow patterns and relate the results to ecologic and behavioral aspects of the species. Furthermore, we sought to explore aspects of the species' evolutionary history and its current distribution in populations. With those objectives in mind, we sequenced the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I from 323 individuals sampled in 15 populations from five States. We calculated genetic diversity indexes, phylogeographic parameters, and performed bayesian and maximum likelihood analysis. All populations presented polymorphism and, in general, Minas Gerais populations showed higher diversity indexes. Diversity mean values were close to that found in others species from the genera. We found high genetic structure, mainly at medium and great distances, with a F_{ST} value of 0,30178. The F_{ST} in São Paulo State (the geographic micro scale) was as low as 0,02996, showing low genetic structure at short distances. The genetic distance didn't show clear relationships with the geographic distance (Mantel test, $p > 0,05$), which may be due to the agent-guide dispersal, including anthropic agents. The analysis of the F_{ST} values obtained exclusively from the females indicates that the males may have a gene flow maintenance effect at short distances. The haplotype network and the bayesian and maximum likelihood phylogenetic trees reported the presence of three genetic clades, not entirely in agreement with the geographic groups' distribution. The estimates point to divergences between the genetic clades dated from the Pleistocene, like reported for various other organisms that live in the Atlantic Rainforest. Our results present an invertebrate species showing phylogeographic patterns similar to that found to other groups, which may indicate common processes in the diversification of Atlantic Rainforest species

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Mata Atlântica.....	1
1.2. A fragmentação ambiental.....	2
1.3. Ordem Araneae – as aranhas.....	4
1.4. A família Nephilidae.....	5
1.5. <i>Nephila clavipes</i>	6
1.6. mtDNA e o gene Citocromo Oxidase I.....	8
1.7. Filogeografia.....	10
1.8. Estudos filogeográficos em biomas brasileiros.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coletas.....	13
3.2. Extração de DNA.....	14
3.3. Amplificação do gene mitocondrial COI por PCR.....	15
3.4. Purificação das amostras.....	16
3.5. Sequenciamento do gene mitocondrial COI.....	16
3.6. Análise dos dados.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Diversidade intrapopulacional.....	18
4.2. Correlação entre o tamanho do fragmento e os índices de diversidade.....	19
4.3. Estrutura genética intrapopulacional.....	19
4.4. Divisão em grupos geográficos e AMOVA.....	23
4.5. Correlação entre distância genética e distância geográfica.....	24
4.6. Relações entre os haplótipos.....	25
4.7. Representação dos clados nas populações.....	26
4.8. Testes de Neutralidade.....	26
4.9. Relações filogeográficas e estimativas de divergência.....	27
5. DISCUSSÃO.....	30
5.1. Diversidade intrapopulacional.....	30
5.2. Estrutura genética interpopulacional.....	31
5.3. Efeito da distância geográfica.....	32
5.4. Relações filogeográficas e estimativas de divergência.....	34
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37
8. ANEXOS.....	46

Lista de Tabelas

1. Relação das coletas realizadas.....	13
2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados.....	15
3. Dados de diversidade para as 15 populações.....	18
4. Valores de F_{ST} par-a-par para as 15 populações.....	20
5. Valores de F_{ST} par-a-par apenas para as populações do Estado de São Paulo.....	21
6. Valores de F_{ST} par-a-par levando em conta apenas as fêmeas.....	22
7. Valores de F_{ST} par-a-par levando em conta apenas as fêmeas do Estado de São Paulo.....	23
8. Dados de diversidade para os três grupos definidos na AMOVA.....	23
9. AMOVA realizada para os grupos São Paulo, Minas Gerais e Sul.....	24
10. Testes de Neutralidade para as 15 populações.....	27
11. Testes de Neutralidade para os clados 1, 2 e 3.....	27

Lista de Figuras

1. Extensão da Mata Atlântica pelo território sul-americano.....	1
2. Fêmea de <i>Nephila clavipes</i>	6
3. Áreas de Estudo.....	14
4. Correlação entre os índices de diversidade e o tamanho do fragmento.....	19
5. Gráfico do Teste de Mantel.....	24
6. Rede de haplótipos.....	25
7. Representação dos clados 1, 2 e 3 nas populações.....	26
8. Representação dos ramos da árvore de máxima verossimilhança.....	28
9. Árvore Bayesiana e estimativas de divergência.....	29

1. Introdução

1.1. A Mata Atlântica

A Mata Atlântica estendia-se, antes da chegada dos colonizadores ao Brasil, por cerca de 1.300.000 km² do território brasileiro, desde o estado do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Morellato & Haddad, 2000), e a oeste até a Argentina e o Paraguai (Câmara, 2003). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística agrupa como “Mata Atlântica” um conjunto de ambientes que compreende florestas ombrófilas e semidecíduas, que variam de acordo com o regime de chuvas, além de áreas de transição entre esses tipos de vegetação (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1993).



Figura 1: Extensão da Mata Atlântica pelo território sul-americano. Dados do ano 2000. Extraído de Câmara, 2003.

Por ser um bioma extenso no sentido latitudinal, bem como por possuir grande variação de altitude e diversos regimes climáticos diferentes, a Mata Atlântica é detentora de uma enorme biodiversidade. Além do alto número de espécies, a taxa de endemismo também é muito alta: o Ministério do Meio Ambiente estima taxas de pelo menos 20% para plantas e os grandes grupos de vertebrados, podendo chegar a até 95% em outros grupos (Brown & Brown, 1992).

Historicamente, muitos processos contribuíram para moldar a Mata Atlântica. Boa parte dessas mudanças foi devida a variações climáticas. O período Quaternário, em especial o Pleistoceno, apresenta fortes indícios de flutuações climáticas, caracterizado por uma complexa série de períodos quentes (similares aos dias de hoje) e períodos frios (eras glaciais), com transições muito curtas entre eles (Dansgaard *et al*, 1993). Todos esses períodos alternantes

podem ter alguma influência nos padrões presentes de diversidade e distribuição das espécies (Svenning & Skov, 2004). Em zonas temperadas, estudos com diversos tipos de organismos apontam tempos de divergência compatíveis com as oscilações climáticas, além de apontar indícios de expansão recente em populações situadas em regiões mais severamente afetadas pelas glaciações (Cooper *et al*, 1995; Santucci *et al*, 1998). Além disso, os padrões de paleopólen também apontam para a contração de alguns tipos de vegetação para as regiões de mais baixas latitudes àquela época (Hewitt, 2000).

Nas regiões tropicais, os estudos desse tipo são bem mais recentes. Ainda assim, indicam padrões bastante parecidos aos descritos para as regiões temperadas: muitos organismos apresentam grandes linhagens datadas do Pleistoceno, além de indícios de expansão recente em populações, provavelmente ocupando locais que só se tornaram habitáveis para a espécie após os ciclos glaciais (Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval *et al*, 2009; Thomé *et al*, 2010).

Entretanto, as perturbações históricas por causas naturais não são o único fator responsável por moldar os padrões genéticos das populações de ambientes tropicais. Além dos efeitos históricos, a Mata Atlântica sofreu intenso processo de fragmentação devido a ações antrópicas desde a época do descobrimento. A ocupação se deu pela costa, nos domínios do bioma. Atualmente, pelo menos 100 milhões de brasileiros vivem em mais de 3000 cidades espalhadas em terrenos que uma vez foram tomados por Mata Atlântica; as florestas restantes se encontram ainda sob intensa pressão. Além da devastação, os remanescentes encontram-se severamente fragmentados (Ministério do Meio Ambiente, 1999). Hoje o bioma encontra-se reduzido para algo em torno de 7,9% de sua formação original (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2012).

Por causa das altas taxas de diversidade, endemismo e devastação, a Mata Atlântica foi incluída na lista dos 25 *hotspots* mundiais para conservação (Mittermeier *et al*, 1999). Entretanto, a situação de conservação do bioma não atingiu patamares adequados. Em 1898 foi criada a primeira área de proteção de Mata Atlântica no Estado de São Paulo. Desde então, 102 áreas de proteção com mais de 10 km² abrigam cerca de 19,73% do remanescente da Mata, ou pouco mais de 1% da área total do bioma (Câmara, 2003). Tal destruição florestal pode ter resultado na perda de muitas populações, além da potencial erosão da diversidade genética de várias espécies (Brown & Brown, 1992).

1.2. A fragmentação ambiental

O Brasil é um dos países mais diversos do mundo. Entretanto, a maior parte da atenção que o país recebe não é pela biodiversidade presente, e sim pelo que foi perdido através do desmatamento e outras perturbações. Boa parte das paisagens naturais foi transformada em

plantações, pastos, áreas industriais e de ocupação urbana (Mittermeier *et al*, 2005). Isso levou a uma perda inestimável de área de todos os biomas, incluindo as duas florestas tropicais presentes no território, que hoje apresentam domínio completamente fragmentado.

A fragmentação do habitat pode influenciar fortemente a biodiversidade de um ecossistema. Nas florestas tropicais, a fragmentação parece ter um efeito significativo na estrutura da comunidade e na dinâmica da população (Groeneveld *et al*, 2009; Pütz *et al*, 2011).

A fragmentação florestal pode fazer com que populações de organismos que outrora eram grandes e conectadas por fluxo gênico, tornem-se subdividas, com tamanho reduzido e confinadas a manchas de habitat pequenas e discretas. Essa alteração na dinâmica inter-populacional pode afetar a persistência das espécies que vivem nesses habitats; além de sofrerem com os efeitos da deriva genética, as subpopulações isoladas tendem a se tornar endogâmicas, e geneticamente diferenciadas das outras (Johansson *et al*, 2007). A fragmentação ambiental, conjuntamente com a redução dos habitats, está entre as maiores causas da diminuição populacional e extinções locais (Richter *et al*, 2009).

A conectividade entre os fragmentos de habitat representa não apenas um aspecto essencial na dinâmica populacional, como também pode ter importantes consequências evolucionárias. A matriz separando as populações pode impedir ou facilitar a dispersão, bem como o fluxo gênico, moldando os padrões de variação gênica. Compreender como a estruturação e processos dos fragmentos de habitat afetam o fluxo gênico é crucial para melhorar as estratégias de conservação.

As consequências da fragmentação ambiental dependem da capacidade de dispersão da espécie. Se os mecanismos de dispersão são eficientes, a estruturação de suas populações ocorre de maneira mais lenta, pois o fluxo gênico pode ser, em parte, mantido. Além disso, os padrões de diversidade genética podem ser mantidos por dinâmica de metapopulações (Zellmer & Knowles, 2009). O tamanho dos fragmentos também pode interferir na dinâmica das populações, pois aquelas presentes em fragmentos pequenos ou médios podem apresentar variação anual na abundância de indivíduos, o que sinalizaria instabilidade demográfica (Dixo, 2005).

Em alguns organismos, a matriz entre os fragmentos pode constituir uma barreira significativa para a dispersão (Marshall *et al*, 2006). As aranhas constituem um bom modelo de estudo para entender as consequências do processo de fragmentação ambiental, bem como processos históricos que moldaram a distribuição da variabilidade genética, já que este grupo possui espécies com modos de dispersão bastante diferentes e também com diferentes exigências ambientais (Ramirez e Fandino, 1996; Ramirez e Haakonsem, 1999; Colgan *et al*, 2002; Marshall *et al*, 2006).

1.3. Ordem Araneae – as aranhas

As aranhas (Arachnida: Araneae) compreendem uma porção bastante significativa da diversidade de artrópodes terrestres (Toti *et al.*, 2000), amplamente distribuídas em quase todas as regiões do mundo. A ordem Araneae é considerada uma das maiores ordens de artrópodes: são mais de 43.000 espécies descritas, organizadas em 111 famílias (Platinick, 2012).

O grupo é dividido em duas subordens, Mesothelae (uma família, de ocorrência exclusivamente asiática) e Opisthothelae. Esta última compreende duas superfamílias, Mygalomorphae (aranhas caranguejeiras e assemelhados) e Araneomorphae - as aranhas “verdadeiras” (Brusca & Brusca, 2007).

A superfamília Araneomorphae compreende aproximadamente 90% das aranhas conhecidas. São diagnosticadas, principalmente, pelas quelíceras verticais e presença de seis fiandeiras (Foelix, 1996).

No Brasil já foram descritas em torno de quatro mil espécies e infere-se a existência de mais seis mil; estima-se que só no Estado de São Paulo haja cerca de mil e duzentas espécies, das quais apenas setecentas são conhecidas (Brescovit, 1999). Os principais trabalhos sobre diversidade de aranhas no Brasil concentram-se em regiões de Mata Atlântica, sobretudo em áreas da Serra do Mar e em ilhas (Brescovit *et al.*, 2004b; Benati *et al.*, 2005; Indicatti *et al.*, 2005).

Embora sejam uma parte visivelmente marcante da fauna, os invertebrados terrestres (em especial as aranhas) tem sido negligenciados historicamente nos estudos genéticos e moleculares. O foco principal é dado, normalmente, a espécies mais comuns ou mais “carismáticas”. Para as aranhas, em especial, a falta de um genoma sequenciado e o alto nível de variabilidade genética no grupo como um todo são fatores que entram as pesquisas (Bond *et al.*, 2001). Entretanto, esses táxons menos visíveis, que geralmente possuem alta persistência, estilo de vida sésil ou sedentário e requisitos ecológicos bastante específicos são grandes candidatos a apresentarem sinais filogeográficos mais fortes do que os grupos mais comumente estudados (Moritz *et al.*, 2001).

Enquanto no Brasil as pesquisas desse tipo ainda não representem fielmente a diversidade existente no país, alguns trabalhos recentes em climas tropicais e temperados começam a mudar esse panorama. Estudos na Austrália (Beavis *et al.*, 2011; Cooper *et al.*, 2011), nos Estados Unidos (Croucher *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2011), no Caribe (Crews *et al.*, 2010) e na Ásia (Su *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2011) mostram que a grande variedade de estilos de vida da Ordem Araneae certamente é refletida nos resultados obtidos.

Dentre os padrões observados, a baixa eficiência da dispersão é apontada como responsável por grandes níveis de estruturação genética encontrados em algumas espécies de aranhas (Beavis *et al.*, 2011, Cooper *et al.*, 2001). A escolha do habitat também pode afetar a distribuição da variabilidade genética (Beavis *et al.*, 2011).

A fragmentação ambiental recente também afeta diretamente os padrões de fluxo gênico entre populações de aranhas, diminuindo os níveis de fluxo gênico; dessa maneira, a perda de habitat adequado pode interferir na dinâmica genética das espécies (Reed *et al*, 2011). Por outro lado, eventos históricos também desempenham importante papel na divergência de grupos dentro das espécies (Beavis *et al*, 2011; Cooper *et al*, 2011).

Crews *et al*, 2010, apontam outra maneira de perturbação que a ação antrópica pode exercer sobre o padrão de variabilidade das espécies. Espécies continentais do gênero *Selenops* no Caribe não apresentam fortes indícios de estruturação. As espécies, entretanto, não são dispersores eficazes, e a distância genética não se correlaciona com a distância geográfica. Os autores inferem que os indivíduos podem ser transportados por agentes, em sua maioria humanos, que distribuem os haplótipos aleatoriamente ao longo da distribuição da espécie.

Outro fator que pode afetar a estruturação genética de populações é a dispersão diferencial entre os sexos. Cooper *et al* (2011) e Croucher *et al* (2011) indicam que boa parte da estruturação observada em seus dados de mtDNA para *Moggridea spp.* e *Theridion californicum* pode ser explicada pela menor movimentação das fêmeas – as responsáveis pela transmissão do mtDNA. Mesmo na ausência de barreiras significativas para o fluxo gênico, divergências substanciais no mtDNA podem surgir do isolamento por distância.

Apesar da significativa quantidade de estudos sobre ecologia de aranhas orbitelas (aquelas que tecem teias orbiculares) e do aumento da quantidade de estudos genéticos, ainda há uma grande defasagem de estudos na América do Sul, além de grupos importantes como a família Nephilidae não serem comumente contempladas (Moore, 1977).

1.4. A família Nephilidae

A família Nephilidae foi primeiramente descrita por Kuntner, 2006, sendo formada por espécies anteriormente pertencentes à família Tetragnathidae. É atualmente composta por 4 gêneros e 61 espécies distribuídas principalmente na América, África, Ásia e Oceania (Platinick, 2012). Nesses locais, as espécies são grandes construtoras de teias, estas podendo muitas vezes chegar a mais de um metro de diâmetro (Kuntner *et al*, 2008). As espécies são notoriamente conhecidas por apresentarem marcante dimorfismo sexual, sendo as fêmeas gigantes muitas vezes maiores que os machos (Kuntner *et al*, 2008; Kuntner & Coddington, 2009).

A família Nephilidae compreende os gêneros *Herennia*, da Australasia; *Clitaetra*, afrotrópica; *Nephila* e *Nephilengys*, ambos pantropicais (Kuntner, 2006). As espécies são essencialmente tropicais, sendo poucas de clima temperado. Nos últimos anos, algumas delas tem sido muito bem estudadas em diversos aspectos e intensas revisões para todos os gêneros foram elaboradas (Kuntner, 2005, 2006, 2007; Kuntner *et al*, 2008).

Dentre os gêneros, *Nephila* é o mais abundante e mais globalmente distribuído. As espécies tem distribuição basicamente tropical e, nesses ambientes, tecem teias orbiculares, de coloração dourada (o que dá a elas o nome popular de “*golden orb web spiders*”), que podem chegar a até 1,5m de diâmetro (Kuntner, 2006).

É um gênero bastante estudado, cuja monofilia é reconhecida por diversos trabalhos (Álvarez-Padilla *et al*, 2009; Kuntner *et al*, 2008). Possui 15 espécies válidas (Kunter & Coddington, 2009) que são estudadas principalmente pelas propriedades de suas teias (e.g. Guan *et al*, 2012; Moisenovich *et al*, 2012; Steven *et al*, 2012). Além disso, vem sendo tratado como modelo para estudos de comportamento sexual (Rittschof, 2010; Michalik & Rittschof, 2011), evolução da vida em grupo (Rypstra, 1985; Hodge & Uetz, 1992), realocação e estrutura das teias (Rittschof & Ruggles, 2010; Blamires *et al*, 2010), biogeografia, filogeografia e variabilidade genética (Tso *et al*, 2002; Lee *et al*, 2004; Su *et al*, 2007, 2011), entre outros tópicos.

Os padrões de dispersão de *Nephila* nunca foram devidamente estudados. Embora não haja episódios documentados, diversos autores (Su *et al*, 2007; Kuntner & Agnarsson, 2011a) citam a grande probabilidade de que os indivíduos juvenis de *Nephila* sejam capazes de realizar dispersão por balonismo – comportamento conhecido em muitas famílias de aranhas (inclusive Araneidae e Tetragnathidae), que consiste em alçar o corpo no ar com o auxílio de um fio de teia. Dessa maneira, os indivíduos são carregados com o vento e podem percorrer longas distâncias (Bell *et al*, 2005).

1.5. *Nephila clavipes*



Figura 1: Fêmea de *Nephila clavipes*. Foto por Thadeu Sobral.

Nephila clavipes é a espécie mais conspícua do gênero na América, com uma distribuição que abrange dos Estados Unidos até a Argentina (Platinick, 2012). Possui um ciclo anual (Moore, 1977; Viana, 1972), no qual as fêmeas constroem suas grandes teias em florestas abertas, no tronco das árvores ou nas camadas arbustivas mais altas, podendo chegar a até 7 metros de altura. Podem, também, estabelecerem-se perto de estradas, trilhas e cursos d'água, sempre em microclimas altamente úmidos (Rypstra, 1985; Moore, 1977; Robinson & Mirick, 1971). Alimentam-se principalmente de presas voadoras (tais como moscas, abelhas, vespas e pequenos lepidópteros) que ficam aderidas à superfície da teia (Robinson & Mirick, 1971). Os machos, de tamanho muito menor que o das fêmeas, vivem nas teias destas, não construindo teia própria na idade adulta (Moore, 1977).

Apesar de normalmente solitárias, em alguns habitats as fêmeas adultas podem tecer teias entrelaçadas, formando “agregações” nas quais os fios periféricos das teias se tocam (Rypstra, 1985). Diversas explicações foram historicamente apresentadas para tal fenômeno. Dentre elas, estão a facilitação do acasalamento (Moore, 1977), o aumento da comunicação entre os indivíduos (Rypstra, 1985), menores taxas de predação (Hodge & Uetz, 1992), o aumento da captura de presas, das taxas de crescimento e de fecundidade (Blamires *et al*, 2010).

Rypstra, 1985, apontou condições para a existência “social”. Somente em regiões em que os níveis de presa sejam bastante elevados os benefícios da vida em grupo superariam o custo metabólico das interações. Quando em baixos níveis de presas, as fêmeas frequentemente demonstraram agressividade com coespecíficos e foram capazes de realocar suas teias para locais com potencialmente maior número de presas. Rittschof & Ruggles (2010) estudaram a realocação das teias e associaram tal fenômeno não apenas à taxa de captura de presas, como também à presença de cleptoparasitas e de machos, sendo que esses fatores podem ter maior ou menor importância dependendo da idade da fêmea.

Em agregados ou em teias individuais, os machos adultos vivem como comensais nas teias das fêmeas. Em cada teia, pode haver um ou mais machos e, no último caso, eles irão competir pelo acasalamento. O vencedor da disputa normalmente ocupa um local mais central na teia, enquanto os demais se dispõem periféricamente, mais sujeitos a predação (Moore, 1977; Rittschof, 2010). Além disso, os machos são capazes de se mover de teia em teia de acordo com o sucesso alcançado no acasalamento – uma vez que alcançam uma teia, podem “avaliar” a situação e “decidir” se mudam ou não de teia (Rittschof, 2010).

Os machos são mais móveis que as fêmeas na idade adulta. Entretanto, quando jovens, ambos os sexos são capazes de movimentos de dispersão. Moore (1977) e Kimmer Jr & Grant (1980) relatam um grande evento de dispersão que ocorre logo após a segunda muda, no qual os indivíduos que ainda permaneciam nos envoltórios dos seus ovos dispersam quase que coordenadamente. Como levantado por alguns estudos (Su *et al*, 2007; Kuntner & Agnarsson, 2011a), há a possibilidade de esse movimento de dispersão se dar por balonismo.

Além disso, Moore (1977) descreve uma movimentação intermediária entre o balonismo e a movimentação terrestre/cursorial para *N. clavipes*, na qual a aranha emitiria fios de teias que flutuariam com a brisa até tocar em alguma estrutura. Uma teia seria tecida ali rapidamente e a aranha poderia caminhar sobre ela, chegando à outra extremidade.

Embora os mecanismos de dispersão de *Nephila* ainda não sejam muito bem compreendidos, seus efeitos já foram observados indiretamente em alguns trabalhos. Tso *et al* (2002) estudaram isozimas em populações de *N. maculata* em Taiwan e encontraram baixos valores de F_{ST} e alto número de migrantes por geração. Lee *et al* (2004), utilizando populações de *N. pilipes* em Taiwan e o marcador mitocondrial COI, encontrou baixas diversidades haplotípica e nucleotídica, além de F_{ST} baixos e fluxo gênico consideravelmente alto. Su *et al* (2007) utilizaram também *N. pilipes*, porém numa distribuição muito mais abrangente (Índia, China, Ilhas asiáticas, Filipinas e norte da Austrália), chegando a até 6500km; as diversidades haplotípica e nucleotídica foram superiores ao encontrado por Lee *et al*, porém, assim como o trabalho anterior, não foram observadas grandes estruturações entre as populações, mesmo as mais distantes. Em outro trabalho, Su *et al* (2011) estudando padrões de biogeografia e especiação de espécies do gênero *Nephila*, relatam baixa divergência genética entre indivíduos da mesma espécie separados por grandes distâncias como algo repetidamente reportado (*N. antipodiana*, *N. pilipes*, *N. plumipes*, *N. edulis* e *N. inaurata* – todas asiáticas). Isso sugeriria a existência de substancial fluxo gênico entre as várias populações dessas espécies.

Nephila é, portanto, considerado um gênero bom dispersor, em concordância com Kuntner & Agnarsson (2011a). Dessa maneira, espera-se que *Nephila clavipes* também seja um dispersor eficiente.

1.6. mtDNA e o gene Citocromo Oxidase I

O genoma mitocondrial vem sendo alvo de estudos evolutivos há muito tempo. Em 1979, Brown *et al* fizeram alguns dos primeiros estudos investigando a taxa de evolução do mtDNA quando comparado ao DNA nuclear. Observaram que apesar de o mtDNA manter um arranjo gênico aparentemente estável ao longo da evolução, ele evolui de 5 a 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear – e relacionam isso à sua maior taxa de replicação, que levaria a um maior acúmulo de mutações. Nessa época, já consideraram o mtDNA uma “molécula extremamente útil para biólogos evolucionários para estudar relações entre espécies e populações que divergiram recentemente”.

Atualmente, o genoma mitocondrial é amplamente utilizado como ferramenta para estudos evolutivos, por possuir diversas características como o fato de serem moléculas circulares compactas, com menor ocorrência de íntrons e de herança uniparental (Griffiths *et al*, 2009). Além disso, eventos de recombinação são extremamente raros, a taxa de mutação é

maior que a do DNA nuclear, e há alta congruência entre os genes do mtDNA de todos os animais. Destacam-se, ainda, facilidade no isolamento e amplificação desta molécula (Caterino *et al*, 2000) e a grande abundância de cópias da mesma molécula em cada célula (Simon *et al*, 1994).

Todas essas características, aliadas ao fato de o mtDNA exibir variação entre indivíduos de uma mesma população e também entre indivíduos de populações diferentes, fazem com que ele seja um marcador molecular bastante útil para estudos de estrutura populacional e variação geográfica intraespecífica (Harrison, 1989). Avise (2004) também aponta que a evolução rápida e a herança não recombinante o tornam um ótimo marcador para estudos intrapopulacionais.

Dentre os genes do mtDNA, o Citocromo Oxidase I (COI) é amplamente utilizado em estudos evolutivos, havendo *primers* já descritos, funcionais para boa parte dos filos de metazoários (Folmer *et al*, 1994). O gene é presente em todos os animais, e a raridade de inserções e deleções faz com que o alinhamento e comparação entre as sequências sejam facilitados (Barret & Hebert, 2005). Pelo fato de ser um gene codificante de proteína, há uma alta incidência de substituição de nucleotídeos na terceira posição dos códons. Sua evolução é rápida o bastante para a discriminação não apenas de espécies próximas, como também de grupos dentro de uma espécie (Hebert *et al*, 2003).

Os dados haplotípicos obtidos pela análise desse tipo de marcador podem produzir uma filogenia intraespecífica, uma genealogia gênica. Aliando essa informação à informação geográfica obtida das coletas, é possível estabelecer relações entre os haplótipos e sua distribuição geográfica, inferindo processos como manutenção de fluxo gênico e subdivisão de populações, por exemplo (Gerber *et al*, 2001; Avise, 2004). Estes processos são responsáveis por influências nos padrões de estruturação populacional observado no mtDNA de muitas espécies. Na maior parte das vezes, essa estruturação tende a se relacionar, em maior ou menor grau, à geografia (histórica ou atual).

O gene COI também é muito utilizado como “DNA *barcode*” – um gene que seria capaz de distinguir, por sequenciamento, uma espécie de outra (Hebert *et al*, 2003). Para estudos filogenéticos, a importância do *barcode* reside no fato de existir um “*gap*” na distância genética entre indivíduos da mesma espécie e indivíduos de espécies próximas (Hebert *et al*, 2003). Hebert *et al* (2004) sugeriram um limiar de 3% de divergência genética para esse *gap*; indivíduos com divergências superiores a essas poderiam pertencer a espécies diferentes. Em aranhas, a média de divergência entre indivíduos de espécies diferentes é mais do que uma ordem de grandeza maior do que a divergência entre coespecíficos, corroborando a presença do *gap* (Barret & Hebert, 2005; Robinson *et al*, 2009).

O mtDNA representa, portanto, uma importante ferramenta para o estudo das relações filogeográficas entre populações e espécies próximas nos mais diversos táxons animais.

1.7. Filogeografia

A filogeografia é a disciplina que consiste em estudar os arranjos espaciais de diferentes linhagens genéticas dentro de espécies e entre espécies próximas (Avise, 2009). Essa definição recente difere em alguns pontos da primeira definição oferecida para o termo por Avise *et al* em 1987, quando o termo representava a disciplina criada para buscar uma transposição do pensamento filogenético para o nível microevolutivo.

A base da filogeografia é representada pela teoria da coalescência, segundo a qual as linhagens gênicas podem ser rastreadas até um único ancestral comum; ou seja, cada linhagem gênica *coalesce* num único indivíduo (Avise, 2009). E isso é verdadeiro para todas as linhagens gênicas presentes numa população, mesmo que elas não coalesçam no mesmo ponto. Uma população atual possui, então, uma ou mais linhagens gênicas que mantiveram-se até o presente. O grande objetivo da filogeografia é utilizar as árvores filogenéticas dessas linhagens para inferir forças evolutivas históricas e contemporâneas que ajudaram a produzir a atual arquitetura genética das populações (Avise, 2009).

Apesar da maior parte dos estudos ainda ser feito utilizando como principal marcador molecular o mtDNA, existe uma tendência para que ele seja utilizado em conjunto com demais marcadores nucleares (Brito & Edwards, 2009). Entretanto, mesmo com essas novas abordagens, o mtDNA não deve ser abandonado para esse tipo de estudo. A utilização dos marcadores mitocondriais revelam diferentes aspectos de uma história complexa e em diferentes profundidades de percepção em relação aos marcadores nucleares (Zhang & Hewitt, 2003). Além disso, o tamanho efetivo dos marcadores mitocondriais é diferente dos marcadores nucleares, o que faz com que a deriva genética cause divergência a uma taxa quatro vezes maior nos mitocondriais, de forma que a estrutura filogeográfica esperada é maior do que a nuclear (Moore, 1995). O fato de a monofilia ser mais comum no mtDNA do que nos genes nucleares também faz com que o marcador mitocondrial forneça visualizações mais claras da história filogeográfica (Zink & Barrowclough, 2008).

1.8. Estudos filogeográficos em biomas brasileiros

No Brasil, o uso da filogeografia tem ajudado a esclarecer processos que governaram a formação dos principais biomas, além de ilustrar a história evolutiva de diversas espécies. Os estudos concentram-se principalmente em espécies de florestas tropicais úmidas, como a Mata Atlântica (Carnaval *et al*, 2009; Resende *et al*, 2010) e a Amazônia (Pellegrino *et al*, 2011).

Ambas as abordagens apontam para o Pleistoceno como uma época chave. As oscilações climáticas características desse período podem ter causado mudanças na forma e na distribuição dos biomas e, por consequência, da distribuição das espécies que neles habitam. Dessa maneira, nos períodos glaciais as florestas ficariam restritas a “manchas” isoladas por uma matriz de vegetação aberta, e os organismos dentro de cada mancha ficariam isolados dos

indivíduos da mesma espécie presentes em outras manchas. Assim, os organismos isolados poderiam divergir e se diferenciar (Brown & Ab'Saber, 1979; Haffer & Prance, 2001). O trabalho de Brown & Ab'Saber, 1979, ainda indica que áreas abertas dominaram a paisagem da Mata Atlântica durante certo período do Pleistoceno tardio, corroborando a existência dos ciclos coerentes com as flutuações climáticas.

Essa hipótese recebe suporte de diversos trabalhos recentes que analisaram padrões de variabilidade e distribuição geográficas de espécies da Mata Atlântica. Vários organismos que habitam a Mata Atlântica apresentam divisão entre as populações ao norte e ao sul. Tal padrão parece ser recorrente, enquanto as populações mais ao sul frequentemente apresentam sinais de expansão populacional recente (Cabanne *et al*, 2007; Carnaval *et al*, 2009; D'Horta *et al*, 2011). Além disso, as datas de divergências entre os grupos frequentemente são estimadas no Pleistoceno (Cabanne *et al*, 2007; Pessoa, 2008; Carnaval *et al*, 2009; Thomé *et al*, 2010; D'Horta *et al*, 2011). Além disso, regiões entre o norte do Estado de São Paulo e o sul do Estado de Minas Gerais já foram reportadas como regiões de contato secundário entre diferentes linhagens gênicas isoladas (Cabanne *et al*, 2007; D'Horta *et al*, 2011).

Talvez a grande dificuldade desse tipo de trabalho seja diferenciar quanto da estruturação das populações é devido a fatores históricos – tais como as flutuações climáticas do Pleistoceno – e quando é devido a causas mais recentes, principalmente a ação antrópica. Essa questão é ainda mais importante quando nota-se o grau de perturbação que esses grandes biomas brasileiros sofreram desde a época da colonização (Dantas *et al*, 2011).

2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo estudar os padrões de variabilidade e estruturação genética em populações de fragmentos de Mata Atlântica, utilizando a espécie *Nephila clavipes* como modelo. Os estudos foram realizados em micro e macroescala, a fim de inferir padrões de fluxo gênico e relacionar os resultados com aspectos comportamentais e ecológicos da espécie.

Além disso, buscou-se analisar a distribuição geográfica de diferentes linhagens gênicas através das análises filogeográficas, para explorar aspectos da história evolutiva da espécie e sua corrente distribuição em populações.

Objetivos específicos:

- Analisar a variabilidade genética dentro e entre os diferentes fragmentos, utilizando o marcador de mtDNA;
- Estimar o fluxo gênico e inferir padrões de dispersão da espécie;
- Discutir a variabilidade e estruturação genética observada nas populações;
- Inferir relações entre os haplótipos obtidos e sua distribuição geográfica;
- Estimar tempos de divergência entre diferentes linhagens gênicas;
- Analisar conjuntamente a distribuição geográfica dos haplótipos e o tempo de divergência das linhagens para inferir possíveis eventos que contribuíram para moldar a diversificação do grupo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Coletas

As coletas foram realizadas entre junho de 2008 e abril de 2012, preferencialmente nos meses com maiores índices pluviométricos. Todos os indivíduos foram coletados manualmente ou com auxílio de puçá entomológico e tiveram seu DNA extraído imediatamente ou, em alguns casos, foram conservados em etanol 100% para posterior extração. Foi obtido um total de 15 populações e 388 indivíduos. O abdômen das fêmeas e os pedipalpos dos machos foram individualmente conservados em etanol 100% e utilizados para identificação.

Tabela 1: Coletas realizadas.

Data	População	Local	Nº de indivíduos
11/06/2008	1	Mata de Santa Genebra – Campinas/SP	28
25/03/2009	6	Serra do Japi – Jundiaí/SP	12
27/04/2009	2	Parque Ecológico – Campinas/SP	20
20/05/2009	5	Observatório – Valinhos/SP	27
27/05/2009	6	Serra do Japi – Jundiaí/SP	10
08/06/2009	4	Sousas – Campinas/SP	09
04/03/2010	12	Sapiranga/RS	34
11/01/2011	3	Parque Hermógenes Leitão Filho – Campinas/SP	11
06/02/11	13	Juiz de Fora/MG	37
07 e 08/02/11	14	Viçosa/MG	32
10/02/11	15	Belo Horizonte/MG	29
23/03/11	7	Porto Feliz/SP	29
26/03/11	8	Rio Claro/SP	26
15 e 16/04/11	10	Foz do Iguaçu/PR	30
25/11/11	9	Descalvado/SP	04
22/03/12	9	Descalvado/SP	18
29/03/12	11	Ibirama/SC	12
03/04/12	4	Sousas – Campinas/SP	20
		Total	388

O desenho amostral foi elaborado de modo que fossem coletadas populações compreendendo diferentes Estados das regiões Sudeste e Sul. A análise em diferentes escalas geográficas pode ser realizada, uma vez que as distâncias entre as populações variam de 4-20 km (populações paulistas – microescala geográfica) a até 1307 km (macroescala geográfica).

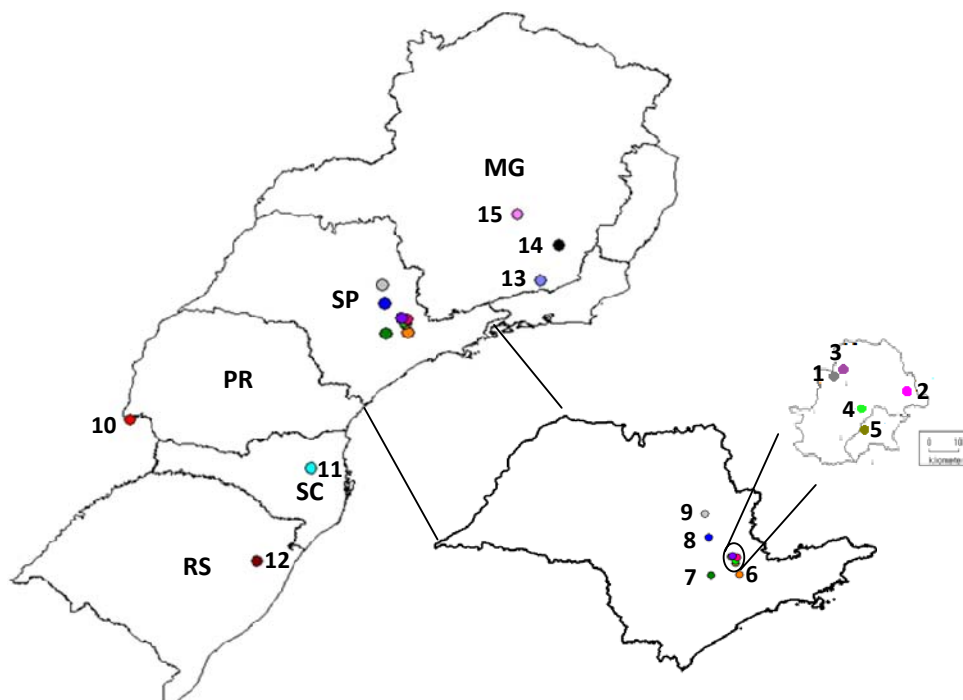


Figura 3: Áreas de estudo. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado; 10 – Foz do Iguaçu; 11 – Ibirama; 12 – Sapiranga; 13 – Juiz de Fora; 14 – Viçosa; 15 – Belo Horizonte.

3.2. Extração de DNA

O abdômen de todos os indivíduos foi retirado e, para fins da extração de DNA, foram utilizados apenas o prossoma e as patas. O opistossoma não foi utilizado por conter excesso de material que poderia atrapalhar a amplificação de DNA; além disso, ele contém a genitália feminina, utilizada para identificação. Os indivíduos foram macerados utilizando-se almofariz e pistilo com o auxílio de nitrogênio líquido. A partir de então, utilizou-se o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), adaptando-se um protocolo a partir do sugerido pelo fabricante. O protocolo final consistia em:

- 1) Adição ao tecido macerado de 600µL de solução de lise nuclear (*Nuclei Lysis Solution*);
- 2) Os tubos foram aquecidos a 65°C por 4 horas;
- 3) Adição de 200µL de solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*);
- 4) Centrifugação a 18.000g e 25°C por 10 minutos;
- 5) Sobrenadante transferido para um novo microtubo contendo 200µL de *Protein Precipitation Solution*;
- 6) Centrifugação a 18.000g e 25°C por 10 minutos;
- 7) Sobrenadante transferido para um novo microtubo contendo 600µL de álcool isopropílico absoluto gelado;
- 8) Centrifugação a 18.000g e 4°C por 10 minutos;

- 9) Descarte do sobrenadante e adição de 600µL de etanol 70% gelado;
- 10) Centrifugação a 18.000g e 4°C por 3 minutos;
- 11) Descarte do sobrenadante.
- 12) Secagem do material por um período de 6-12 horas;
- 13) Ressuspensão em 30µL de H₂O miliQ;
- 14) Descanso por 30 minutos a temperatura ambiente;
- 15) Congelamento para estocagem.

A extração do DNA de fêmeas e machos diferiu basicamente no número de tubos resultantes para cada um. Como as fêmeas de *N. clavipes* são muito maiores que os machos, o produto macerado de cada indivíduo era bastante superior ao macerado de um macho. Portanto, com cada fêmea foi possível a obtenção de até três tubos contendo DNA (cerca de dois gramas de macerado por tubo), enquanto que para os machos apenas um tubo era o suficiente para conter todo o material.

3.3. Amplificação do gene mitocondrial COI por PCR

Foram utilizados *primers* universais para amplificação do gene COI em invertebrados, LCO1490 e HCO2198, descritos por Folmer *et al* (1994) e sabidamente funcionais para *Nephila clavipes* (Álvarez-Padilla *et al*, 2009).

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação de COI de *N. clavipes*.

Nome do primer	Sequência 5'-3'
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

A reação foi de 25µL, utilizando o Kit de Amplificação Fermentas. Para 1µL de DNA, foi adicionado 1U de Taq DNA polimerase, 2,8mM de MgCl₂, Tampão de reação KCl 1x, 25mM de dNTP, 0,2µM de cada primer e o restante foi completado com H₂O miliQ.

A ciclagem utilizada foi definida ao longo do projeto: desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C e 2 minutos a 72°C; extensão final a 72°C por 3 minutos.

A amplificação foi confirmada por meio de visualização em gel de agarose 2% com tampão TAE 1X. Em cada microlitro de amostra foi aplicado 1µL de GelRed™. A eletroforese foi feita a 60V por cerca de uma hora. O gel foi visualizado em luz ultra-violeta.

Os indivíduos cujas amplificações não foram possíveis com a reação descrita foram purificados para nova tentativa de amplificação.

3.4. Purificação das amostras

Foi utilizado o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com os passos abaixo (para 30µL de amostra):

- 1) Adição de 150µL do Tampão de captura tipo 3;
- 2) Homogeneização e centrifugação por 20 segundos a 18.000g e 25°C;
- 3) Colocação de uma coluna GFX MicroSpin em um tubo coletor; adição do material à coluna;
- 4) Centrifugação a 18.000g por 1 minuto e 25°C;
- 5) Descarte do sobrenadante e adição de 500µL do Tampão de lavagem tipo 1;
- 6) Centrifugação a 18.000g por 1 minuto e 25°C;
- 7) Descarte do sobrenadante e transferência da coluna para um novo microtubo comum;
- 8) Adição de 30µL de água estéril e livre de nucleases;
- 9) Descanso a temperatura ambiente por 1 minuto e 25°C;
- 10) Centrifugação a 18.000g por 2 minutos e 25°C;
- 11) Congelamento para estocagem.

3.5. Sequenciamento do gene mitocondrial COI

Todas as amostras com sucesso na amplificação do gene mitocondrial COI foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG/UNICAMP. As amostras que apresentaram quantidade de DNA superior a 10ng/µL (em comparação com o DNA-padrão LowDNA Mass – Invitrogen) foram diluídas com água miliQ até a concentração definida. Elas foram sequenciadas utilizando-se o BigDye terminator v 3.1 kit e um sequenciador capilar automatizado (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems). Todas as amostras foram sequenciadas no sentido *forward* (primer LCO1490) e *reverse* (primer HCO2198).

3.6. Análise dos dados

As sequências obtidas foram alinhadas com o programa MEGA5 (Tamura *et al*, 2001), que também foi utilizado para os cálculos preliminares sobre diversidade intra e interpopulacional, distância genética média e entre pares de populações. O modelo de substituição mais adequado para as sequências apresentadas foi o Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) com correção gama (TN93+G), usando o critério AIC (Akaike Information Criterion).

Os cálculos de diversidade intrapopulacional, valores de F_{ST} geral e a listagem dos haplótipos foram feitas utilizando o software DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009), que também foi utilizado para gerar arquivos compatíveis com os programas Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) e Network (Bandelt *et al*, 1999).

Os índices de diversidade (número de haplótipos, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica e nucleotídica), F_{ST} par-a-par, além de testes de neutralidade foram feitos no Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Além disso, foi realizada a AMOVA para avaliar a significância da diferenciação genética em diferentes níveis e foi aplicado o teste de Mantel para correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas.

Para medir os efeitos do isolamento por distância entre diferentes classes de distância, foram realizadas regressões simples entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas. Para testar se as classes de distâncias eram diferentes entre si, foi realizada uma ANOVA de um fator com teste *post hoc* de Tukey, no programa STATISTICA (StatSoft, 2010).

A árvore de haplótipos foi feita no programa Network (Bandelt *et al*, 1999).

As estatísticas Bayesianas, a inferência Bayesiana de árvore filogenética e as estimativas de divergência foram feitas utilizando o programa BEAST v1.7.2 (Drummond *et al*, 2012). Foi utilizado um relógio molecular estrito com uma taxa de substituição de 0,0115 bases por milhão de anos (Brower *et al*, 1994), amplamente utilizada como taxa de substituição do gene COI em invertebrados e inclusive utilizada recentemente em estudos com outros grupos de aranhas (Rix & Harvey, 2012). Foram utilizadas duas espécies como grupo externo, *Nephila inaurata* e *Nephila senegalensis*, duas espécies africanas apontadas por Su *et al* (2011) como as mais próximas de *N. clavipes* (sequências obtidas no NCBI, números de acesso HQ441935 e HQ441940, respectivamente). As análises foram feitas através de cadeias de Markov-Monte Carlo com 20 milhões de repetições, amostrando a cada 1000. Para a construção das árvores, foi considerado um descarte (burn-in) do primeiro 10% das árvores (200.000 árvores iniciais), pois já foi o suficiente para haver convergência. Os resultados obtidos no programa BEAST foram visualizados nos programas Tracer v1.5 (Rambault & Drummond, 2007) e FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4. Resultados

4.1. Diversidade intrapopulacional

Dos 388 indivíduos coletados, 323 foram sequenciados com sucesso, sendo 287 fêmeas e 36 machos. A sequência alinhada final representa 491 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. Todas as 15 populações apresentaram polimorfismo, sendo 3 o número mínimo de haplótipos por população (Ibirama), e 10 o número máximo (Viçosa e Serra do Japi), num total de 46 haplótipos. A diversidade haplotípica foi bastante variável entre as populações, apresentando valores entre 0,25 e 0,85, com média de 0,803; já a diversidade nucleotídica também apresentou valores discrepantes, entre 0,00074 e 0,00845, e média de 0,00745. Os dados obtidos para a diversidade das populações encontram-se sumarizados na tabela abaixo.

Tabela 3: Dados de diversidade para as 15 populações de *N. clavipes*. N/Fêmeas = número de indivíduos/número de fêmeas, h = número de haplótipos, s = número de sítios polimórficos, Hd = variabilidade haplotípica, π = variabilidade nucleotídica.

População	N/Fêmeas	h	s	Hd	π
Santa Genebra	26/26	6	8	0,72	0,00473
P. Ecológico	17/13	4	7	0,49265	0,00323
P. Hermógenes	11/9	4	7	0,70909	0,00555
Sousas	20/20	6	9	0,67368	0,00510
Observatório	25/24	8	10	0,81667	0,00596
Serra do Japi	19/19	10	13	0,78363	0,00548
Porto Feliz	26/20	5	8	0,65538	0,00526
Rio Claro	24/16	7	10	0,80435	0,00765
Descalvado	22/22	6	9	0,70996	0,00596
Foz do Iguaçu	30/30	5	7	0,25287	0,00146
Ibirama	11/8	3	2	0,34545	0,00074
Sapiranga	16/12	5	10	0,53333	0,00277
Juiz de Fora	25/25	8	12	0,77	0,00747
Viçosa	30/25	10	16	0,80230	0,00845
Belo Horizonte	21/18	8	15	0,85238	0,00758
Total	323	46	46	0,803	0,00745

Os dados de distância genética dentro das populações seguem os padrões observados para as diversidades haplotípicas e nucleotídicas: algumas populações apresentam distância genética mais elevada entre os indivíduos, enquanto que outras apresentam distância genética muito baixa.

4.2. Correlação entre o tamanho do fragmento e os índices de diversidade

Foram realizadas regressões simples entre o tamanho dos fragmentos transformados para logaritmo de base 2 (tabela 1, Anexo) e as diversidades haplotípicas e nucleotídicas (tabela 3). Tanto os dados de diversidade haplotípica ($R^2 = 0,0816827$) quanto os de diversidade nucleotídica ($R^2 = 0,02227377$) apresentaram correlações não significativas ($p > 0,1$ - figura 3, a e b). Foram testadas, também, as mesmas regressões considerando apenas as populações do Estado de São Paulo; da mesma forma, os resultados não foram significativos ($p > 0,1$).

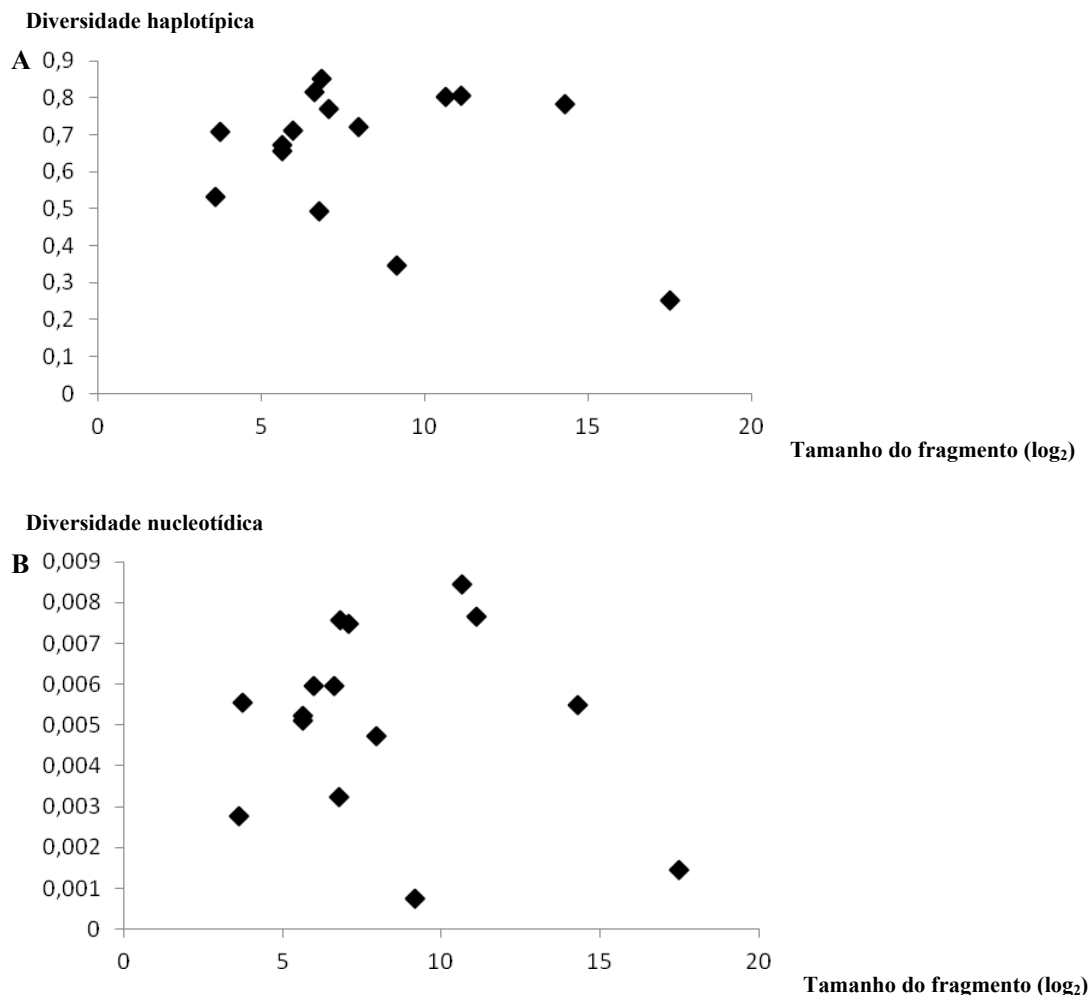


Figura 4: Regressão entre os índices de diversidade e o tamanho dos fragmentos, transformados em logaritmos de base 2. a) Dados comparados com a diversidade haplotípica. b) dados comparados com a diversidade nucleotídica.

4.3. Estrutura genética interpopulacional

A estruturação entre as populações foi estimada de acordo com o parâmetro F_{ST} . O valor geral foi 0,30178 ($\pm 0,0384$); os valores par-a-par encontram-se na tabela 4.

Tabela 4: F_{ST} par a par das 15 populações analisadas. * - Valores significativos. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado; 10 – Foz do Iguaçu; 11 – Ibirama; 12 – Sapiranga; 13 – Juiz de Fora; 14 – Viçosa; 15 – Belo Horizonte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	0,00576													
3	0,11645	0,17441*												
4	-0,02027	0,00097	0,0364											
5	0,03467	0,08803	-0,03661	-0,00962										
6	-0,02165	-0,02197	0,06772	-0,03681	0,01562									
7	0,04447	0,07896*	-0,03689	-0,01501	-0,03172	0,01332								
8	0,08308	0,09668*	0,03846	0,03754	0,0372	0,03677	0,03149							
9	0,05941	0,12578*	-0,0255	0,00216	-0,02915	0,03427	-0,02582	0,03515						
10	0,08698*	0,01412	0,41202*	0,12235*	0,24112*	0,07466	0,23418*	0,23767*	0,28544*					
11	0,10583	0,05724	0,41379*	0,146	0,24616*	0,09175*	0,24936*	0,21885*	0,28582*	-0,00189				
12	0,56444*	0,68062*	0,39283*	0,51209*	0,38701*	0,5932*	0,42058*	0,38721*	0,34047*	0,80429*	0,81977*			
13	0,38771*	0,3864*	0,34911*	0,35977*	0,35511*	0,33415*	0,36484*	0,2219*	0,36051*	0,5078*	0,44943*	0,58569*		
14	0,41888*	0,42511*	0,34076*	0,38367*	0,36361*	0,36684*	0,37342*	0,22626*	0,36007*	0,54052*	0,48767*	0,51121*	0,02156	
15	0,43211*	0,44815*	0,31408*	0,38851*	0,34757*	0,3723*	0,36372*	0,2198*	0,35095*	0,59042*	0,53662*	0,51711*	0,10404*	0,06344*

Boa parte dos pares de populações apresentaram valores de F_{ST} significativos, indicando que, numa macroescala, as populações apresentam-se geneticamente bem estruturadas. A maior parte dos valores significativos concentra-se nas populações de 10 a 15, que são justamente todas as populações de fora do Estado de São Paulo.

Para compor a microescala geográfica, foram isolados os valores de F_{ST} apenas para os pares de populações presentes no Estado de São Paulo (tabela 5).

Tabela 5: F_{ST} par a par mostrando apenas as populações do Estado de São Paulo. * - Valores significativos. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado.

	1	2	3	4	5	6	7	8
2	0,00576							
3	0,11645	0,17411*						
4	-0,02027	0,00097	0,0364					
5	0,03467	0,08803	-0,03661	-0,00962				
6	-0,02165	-0,02197	0,06772	-0,03681	0,01562			
7	0,04447	0,07896*	-0,03089	-0,01501	-0,03172	0,01332		
8	0,08308	0,09688*	0,03846	0,03754	0,0372	0,03677	0,03149	
9	0,05941	0,12578*	-0,0255	0,00216	-0,02915	0,03427	-0,02582	0,03515

O valor geral de F_{ST} considerando apenas as populações do Estado de São Paulo foi 0,02996 ($\pm 0,0451$), muito menor que o valor considerando todas as populações ($F_{ST} = 0,30178$). Além disso, os valores significativos concentram-se na população Parque Ecológico, que apresenta os menores índices de diversidade do Estado.

Para testar os efeitos da dispersão diferencial entre os sexos, os machos foram excluídos da análise. Foram calculados os valores de F_{ST} geral e par a par para as 15 populações considerando apenas os 287 indivíduos fêmeas amostrados. O valor geral encontrado foi 0,28982 ($\pm 0,0412$), menor do que o valor quando os dois sexos foram considerados em conjunto ($F_{ST} = 0,30178$). Os valores comparativos par-a-par foram bastante parecidos com os originais, apresentando um padrão visualmente semelhante. A queda no valor de F_{ST} , no entanto, não foi significativa (tabela 6). O mesmo procedimento foi feito apenas para as populações do Estado de São Paulo, a fim de verificar se o padrão observado na macroescala geográfica se repetiria na microescala. Cento e setenta fêmeas de 9 populações resultaram em um valor geral de F_{ST} de 0,05163 ($\pm 0,0512$), maior do que o valor apresentado quando os dois sexos foram considerados conjuntamente ($F_{ST} = 0,02996$). Dentre os pares de populações (tabela 7), ao serem analisadas apenas as fêmeas os valores significativos concentram-se nas populações de Rio Claro e Parque Hermógenes, duas das populações do Estado de São Paulo com maior proporção de machos coletados. Além disso, o aumento encontrado representa quase o dobro do valor originalmente encontrado para o Estado.

Tabela 6: F_{ST} par a par das 15 populações analisadas, considerando apenas as fêmeas. * - Valores significativos. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado; 10 – Foz do Iguaçu; 11 – Ibirama; 12 – Sapiranga; 13 – Juiz de Fora; 14 – Viçosa; 15 – Belo Horizonte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	-0,01045													
3	0,21717*	0,20977*												
4	-0,02027	-0,03003	0,12798											
5	0,03467	0,03702	0,01167	-0,00962										
6	-0,02165	-0,0426	0,16229	-0,03681	0,01562									
7	0,05587	0,04183	0,00496	-0,00912	-0,03847	0,02222								
8	0,13867*	0,10376	0,11464	0,09145	0,08456	0,08271*	0,07289							
9	0,05941	0,07173	0,01488	0,00216	-0,02915	0,03427	-0,03445	0,08167						
10	0,08698*	0,0592	0,55022*	0,12235*	0,24112*	0,07466*	0,27649*	0,32194*	0,28544*					
11	0,08292	0,0748	0,51723*	0,12029	0,22111*	0,06612	0,26014*	0,24708*	0,25929*	-0,02077				
12	0,5147*	0,57225*	0,24597*	0,45297*	0,32896*	0,48075*	0,34359*	0,35097*	0,2782*	0,78237*	0,77604*			
13	0,38771*	0,34851*	0,37398*	0,35977*	0,35511*	0,33415*	0,35797*	0,181*	0,36051*	0,5078*	0,42464*	0,54155*		
14	0,37818*	0,3426*	0,29644*	0,33872*	0,31687*	0,32204*	0,31228*	0,11686*	0,31102*	0,51562*	0,43151*	0,42948*	0,03933	
15	0,42478*	0,3891*	0,29573*	0,37897*	0,33533*	0,36201*	0,3377*	0,15306*	0,33854*	0,59575*	0,51099*	0,46102*	0,11701*	0,05828

Tabela 7: F_{ST} par a par das populações do Estado de São Paulo, considerando apenas as fêmeas. * - Valores significativos. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado.

	1	2	3	4	5	6	7	8
2	-0,01045							
3	0,21717*	0,20977*						
4	-0,02027	-0,03003	0,12798					
5	0,03467	0,03702	0,01167	-0,00962				
6	-0,02165	-0,0426	0,16229	-0,03681	0,01562			
7	0,05587	0,04183	0,00496	-0,00912	-0,03847	0,02222		
8	0,13867*	0,10376	0,11464	0,09145	0,08456	0,08271*	0,07289	
9	0,05941	0,07173	0,01488	0,00216	-0,02915	0,03427	-0,03445	0,08167

4.4. Divisão em grupos geográficos e AMOVA

Os padrões de diversidade intrapopulacional, bem como os valores significativos de F_{ST} encontrados para as populações indicam três grupos distintos: 1) populações do Estado de Minas Gerais (Belo Horizonte, Viçosa e Juiz de Fora), que apresentam altas diversidades haplotípica e nucleotídica, e altos valores significativos de F_{ST} com as demais populações; 2) populações da região Sul (Foz do Iguaçu, Ibirama e Sapiiranga), que apresentam baixas diversidades haplotípicas e nucleotídicas, e altos valores de F_{ST} entre si e com as demais populações; 3) populações do Estado de São Paulo (Porto Feliz, Rio Claro, Parque Hermógenes, Serra do Japi, Observatório, Descalvado, Sapiiranga, Parque Ecológico e Santa Genebra), que apresentam índices de diversidade intermediários e valores muito baixos ou não significativos de F_{ST} entre si, porém altos valores com a maior parte das populações dos outros grupos.

Tabela 8: Dados de diversidade para os três grupos. N = número de indivíduos, h = número de haplótipos, s = número de sítios polimórficos, Hd = variabilidade haplotípica, π = variabilidade nucleotídica.

População	N	h	s	Hd	π
São Paulo	190	26	26	0,7311	0,00563
Minas Gerais	76	15	22	0,8298	0,00818
Sul	57	11	14	0,5852	0,00502

Para estudar esses grupos foi feita uma AMOVA no programa Arlequin, com as configurações padrão e 1000 repetições. Três grupos foram indicados: um grupo com as populações do Estado de São Paulo; um grupo com populações do Estado de Minas Gerais; e um grupo com as populações dos Estados do Sul.

Tabela 9: Resultados da AMOVA realizada para os três grupos indicados.

Fonte da variação	Porcentagem da variação
Entre os grupos	24,92
Entre as populações dentro dos grupos	11,04
Dentro das populações	64,04

4.5. Correlação entre distância genética e distância geográfica

Para testar os efeitos da distância geográfica na estruturação genética das populações, utilizou-se o Teste de Mantel no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Para isso, construiu-se uma matriz de distância genética pela distância geográfica (tabelas 3 e 4, Anexo). O gráfico resultante indicou uma tendência positiva, porém não significativa ($p > 0,05$).

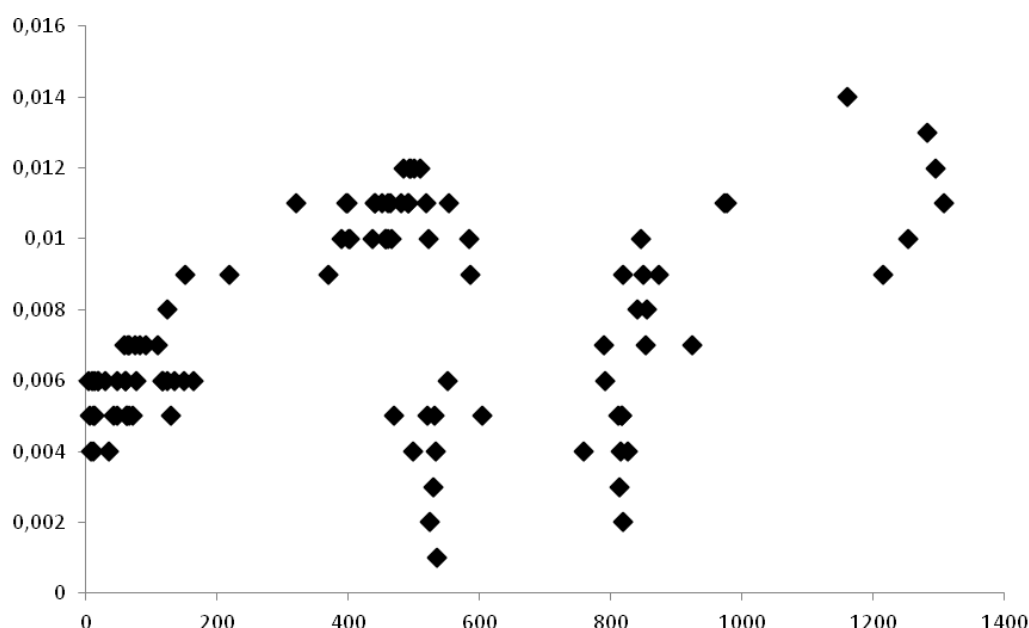


Figura 5: Gráfico do teste de Mantel. Eixo x = distância geográfica (km); eixo y = distância genética (% de sítios divergentes). $R^2 = 0,125128$, $p = 0,058$.

Foram, também, feitos testes de Mantel dentro dos três grupos considerados na AMOVA (Minas Gerais, São Paulo, Sul). Para os três testes, os valores encontrados não foram significativos (MG: $R^2 = 0,514612$, $p = 0,331$; SP: $R^2 = 0,12802$, $p = 0,129$; Sul: $R^2 = 0,178992$, $p = 0,666$).

4.6. Relações entre os haplótipos

Os 46 haplótipos foram utilizados para a construção de uma rede (figura 6) com o programa Network (Bandelt *et al*, 1999). O número de indivíduos por haplótipo, e sua distribuição nas populações encontra-se na tabela 2 do Anexo. Três haplótipos são muito bem distribuídos, estando presentes em pelo menos 10 populações. Por outro lado, foram encontrados muitos haplótipos exclusivos, ou seja, que pertencem a apenas uma população. Um grande grupo de haplótipos exclusivos pode ser atribuído às populações mineiras (Belo Horizonte, Viçosa e Juiz de Fora). Muitos haplótipos que parecem ocorrer apenas nessas localidades encontram-se agrupados na rede de haplótipos construída. São observados três grupos de haplótipos isolados, os clados 1, 2 e 3, melhor visualizados na figura 7a.

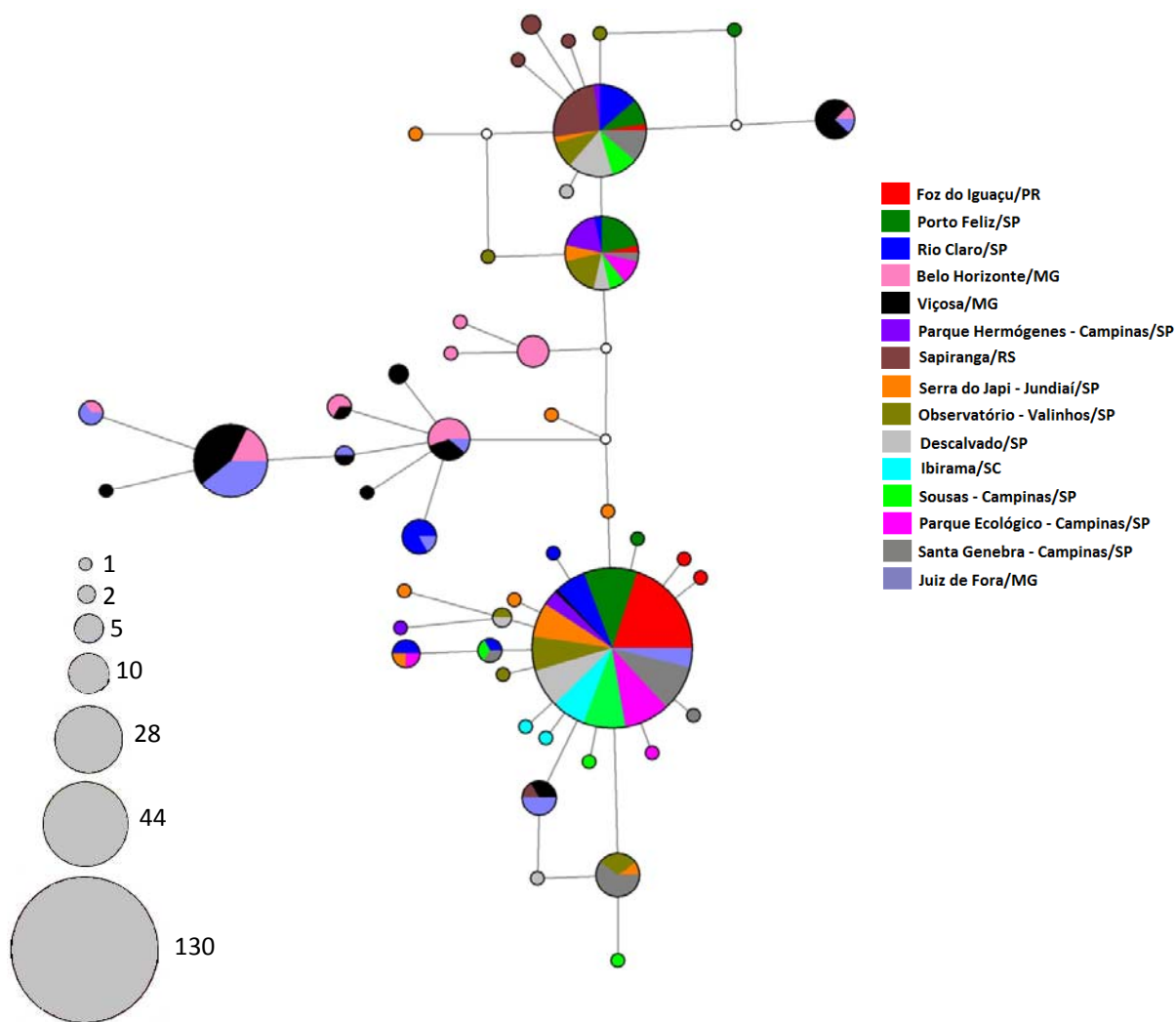


Figura 6: Rede de haplótipos, mostrando as relações entre os 46 haplótipos amostrados. Cada círculo representa um haplótipo, e seu tamanho é proporcional ao número de indivíduos que possuem dado haplótipo. As cores representam as 15 populações (legenda ao lado da figura). Os círculos brancos representam haplótipos hipotéticos. Legenda à esquerda representa o número de indivíduos equivalentes ao tamanho de cada círculo.

4.7. Representação dos clados nas populações

Para visualizar os clados nas populações, cada clado recebeu uma cor: clado 1, azul; clado 2, verde, clado 3, vermelho (figura 7a). A figura 7b representa a proporção de indivíduos pertencentes a cada clado em cada região. A proporção de indivíduos de cada clado nas populações é apresentada na figura 1 do Anexo.

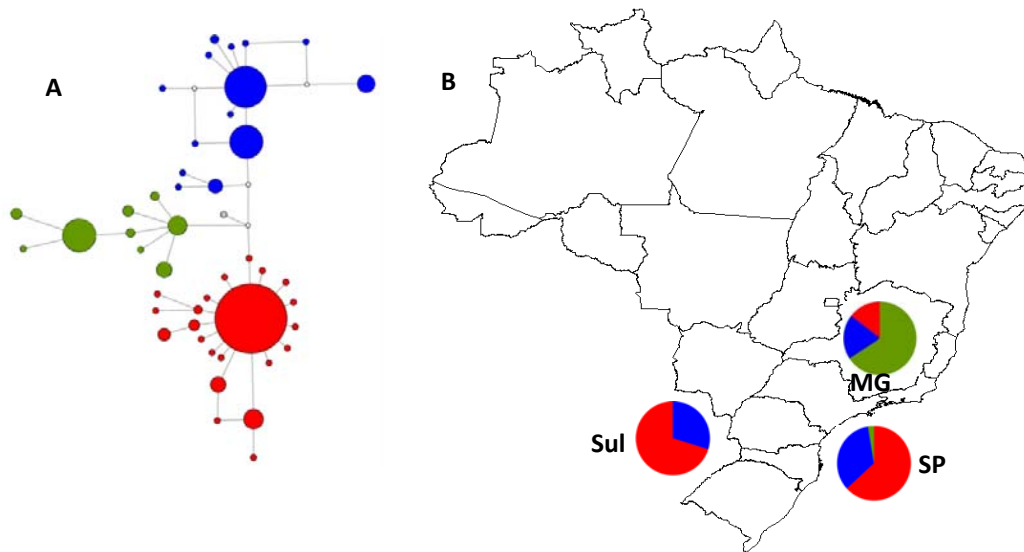


Figura 7: a) Representação dos clados na rede de haplótipos. b) Proporção dos indivíduos de cada clado nas três regiões.

4.8. Testes de Neutralidade

Os testes D de Tajima e F_S de Fu foram realizados a fim de verificar se as populações evoluem de acordo com modelos neutros (tabela 11). Foram também realizados testes de neutralidade em cada um dos três clados (tabela 12).

Tabela 10: Testes de neutralidade para as 15 populações amostradas. * - Valores significativos.

População	D de Tajima	F _s de Fu
Foz do Iguaçu	-1,75911*	-1,51553
Porto Feliz	0,73209	1,94414
Rio Claro	1,30867	1,12366
Belo Horizonte	-0,38958	-0,04716
Viçosa	0,06216	-0,28726
Parque Hermógenes	0,5728	1,52461
Sapiranga	-2,04854*	-0,65863
Serra do Japi	-1,01745	-3,42643*
Observatório	0,34718	-0,39742
Descalvado	0,62112	1,02820
Ibirama	-1,42961*	-1,24552*
Sousas	-0,04279	0,36871
Parque Ecológico	-0,80478	0,90537
Santa Genebra	0,33986	0,6231
Juiz de Fora	0,5225	0,34109

Tabela 11: Testes de neutralidade para os clados. * - Valores significativos.

Clado	D de Tajima	F _s de Fu
1	-1,485*	-6,01861*
2	-0,57152	-1,99305
3	-2,2554*	-29,17963*

4.9. Relações filogeográficas e estimativas de divergência

As relações filogenéticas entre os indivíduos foram inferidas por máxima verossimilhança (figura 8) e por análise bayesiana (figura 9), que também forneceu estimativas dos tempos de divergência entre os principais nós.

Os valores de *bootstrap* foram baixos para quase todos nós da árvore de máxima verossimilhança. De forma geral, as relações estabelecidas nessa árvore coincidem com os clados encontrados na rede de haplótipos, apesar do baixo suporte dos ramos.

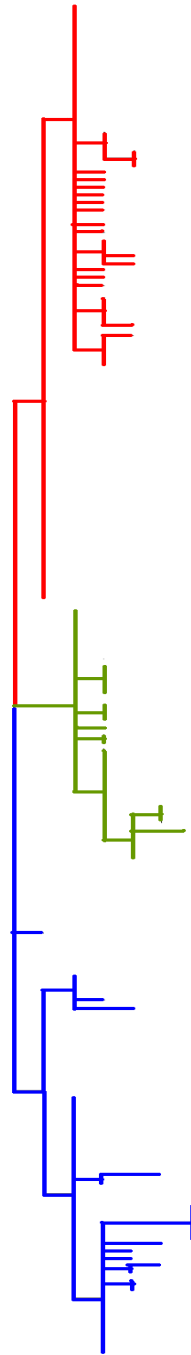


Figura 8: Representação dos ramos da inferência de Máxima Verossimilhança obtida para as sequências através do programa MEGA. As cores, da mesma maneira que a rede de haplótipos da Figura 7a, representam: azul, clado 1; verde, clado 2; vermelho, clado 3.

A divergência entre *N. clavipes* e o grupo externo mais próximo (*N. inaurata*) foi datada do Plioceno. As divergências entre três os grupos de haplótipos datam do Pleistoceno médio/tardio.

As duas árvores apresentam mesma topologia.

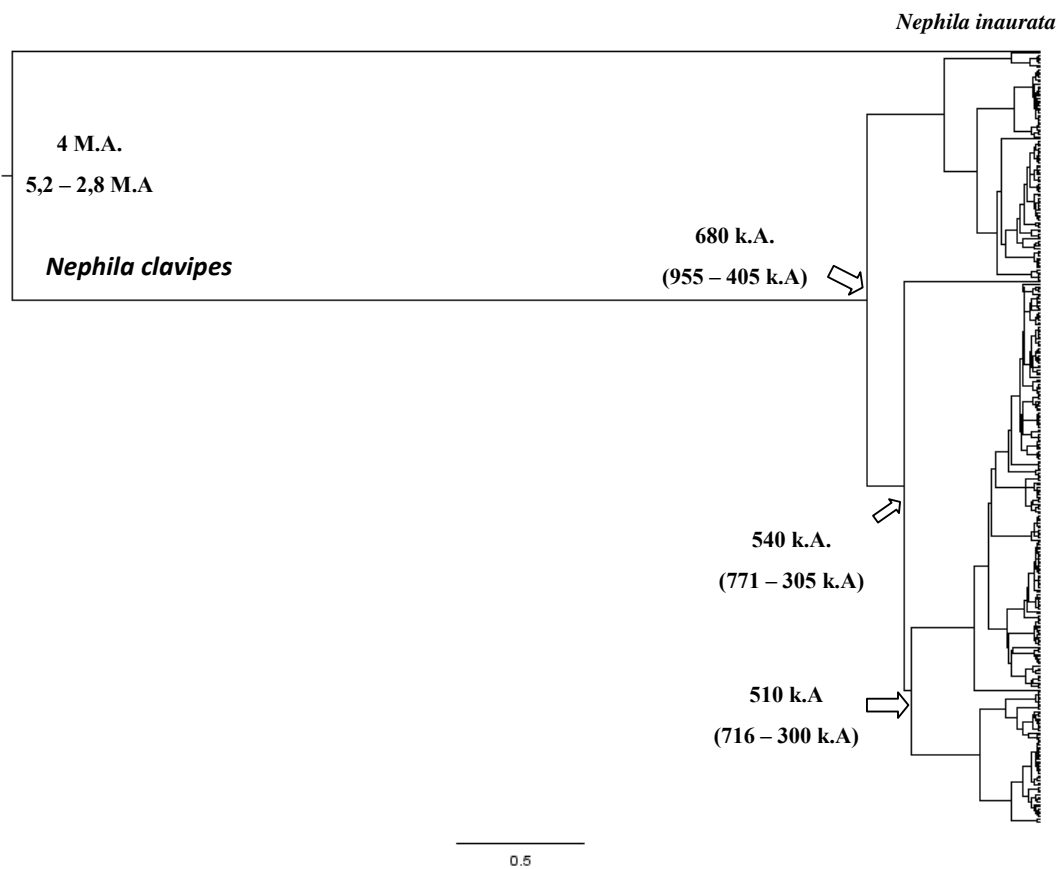


Figura 9: Inferência bayesiana e estimativas de divergência, obtidos no programa BEAST.

5. Discussão

5.1. Diversidade intrapopulacional

Os padrões de diversidade encontrados para o gene COI de *Nephila clavipes* são próximos aos relatados para outras espécies do gênero: $H_d = 0,803$ (0,25287 a 0,85238) e $\pi = 0,00745$ (0,00074 a 0,00845).

Su *et al* (2007) encontraram padrões bastante semelhantes para a espécie asiática *N. pilipes*: $H_d = 0,707$ e $\pi = 0,00768$.

O padrão de baixas divergências haplotípica e nucleotídica parece ser comum nas espécies do gênero *Nephila*. Para *N. antipodiana*, a divergência média entre indivíduos separados por mais de 1000 quilômetros de distância foi de 1,52%. Para *N. clavata*, a distância entre Singapura e as Filipinas representa uma divergência média de apenas 0,62%. Resultados semelhantes foram obtidos para *N. plumipes*, *N. edulis* e *N. inaurata*.

Para *N. clavipes*, o valor máximo de divergência entre os haplótipos também foi baixo. Mesmo com distâncias geográficas superiores a 1300 quilômetros, a divergência máxima não chegou a 2%, mantendo uma média de 0,85%. Portanto, observa-se que as espécies do gênero *Nephila* possuem índices de diversidade genética semelhantes, o que pode ser devido às espécies possuírem modos de vida e escolha de habitat bastante semelhantes.

A ordem Araneae possui grande diversidade de modos de vida e de escolha de habitat e os padrões de variabilidade genética também são bastante variáveis. *Theridion californicum*, uma espécie de Theridiidae presente na costa oeste dos Estados Unidos, apresenta diversidade haplotípica de apenas 0,556 para o gene mitocondrial COI (Croucher *et al*, 2011).; já a espécie australiana *Hadronyche cerberea* apresenta diversidade haplotípica de 0,763, semelhante a *N. clavipes*, porém com diversidade nucleotídica média três vezes maior (Beavis *et al*, 2011).

Nas comparações entre todos os indivíduos, a maior divergência entre duas sequências foi de 1,9%, bastante abaixo dos 3% estipulados por Hebert *et al*, 2004, como indicativo de divergência entre duas espécies. Mesmo com uma grande área de ocorrência e de coleta, nosso trabalho não encontrou nenhum indício molecular ou morfológico de que os indivíduos amostrados representem mais do que uma espécie.

O tamanho do fragmento ambiental pode afetar os índices de diversidade das populações que nele vivem. Populações de organismos da Mata Atlântica, como o anuro *Rhinella ornata*, apresentam significativa queda na diversidade de haplótipos em fragmentos com menores áreas de floresta, possivelmente devido à perda aleatória de haplótipos em fragmentos menores, com menores tamanhos efetivos das populações (Dixo *et al*, 2009).

Os resultados encontrados para *N. clavipes* contrastam com o obtido para *R. ornata*. Tanto para a diversidade haplotípica quanto para a nucleotídica, não foram encontradas correlações significativas com o tamanho do fragmento. Mesmos nas análises levando em conta

apenas as populações do Estado de São Paulo os dados não foram significativos. Dessa maneira, fatores além do tamanho do fragmento devem ser responsáveis pelos padrões de diversidade observados dentro de cada população. As populações do Estado de Minas Gerais apresentaram, em geral, índices de diversidades mais altos que os encontrados para as demais populações, e as populações do Sul apresentaram os menores índices. A diversidade intrapopulacional pode, então, estar de alguma forma relacionada à localização geográfica da população.

5.2. Estrutura genética interpopulacional

O valor geral de F_{ST} foi de 0,30178, considerado muito alto (Wright, 1984) e indicativo de forte estruturação genética. A comparação par-a-par indica que seis populações são as grandes responsáveis pela estruturação encontrada: Foz do Iguaçu, Ibirama, Sapiranga, Juiz de Fora, Viçosa e Belo Horizonte (tabela 4). Elas representam todas as populações amostradas que se localizam fora do Estado de São Paulo. Dentre as populações de São Paulo, os valores de F_{ST} par-a-par foram, em geral, não significativos; os poucos valores significativos foram moderados.

A AMOVA com os três grupos indicados (Minas Gerais; São Paulo; Sul) indicou a maior concentração da variação presente dentro de cada população. Entretanto, ela também aponta que há maior variação entre os grupos do que entre as populações dentro dos grupos. Isso indica que as populações agrupadas, de alguma forma, são mais semelhantes entre si do que as demais populações. Dentre esses três grupos, Minas Gerais possui os índices de diversidade mais altos ($H_d = 0,8298$; $\pi = 0,00818$), São Paulo possui índices próximos à média, e o Sul registra os menores índices ($H_d = 0,5852$; $\pi = 0,00502$).

As espécies do gênero *Nephila* são consideradas boas dispersoras; comparativamente ao gênero mais próximo, *Nephilengys*, *Nephila* tem uma distribuição geográfica muito maior e ainda assim apresenta menores níveis de divergência genética, indicando eficiente fluxo gênico entre suas populações (Kuntner & Agnarsson, 2011b).

Em Taiuan, *N. pilipes* apresenta ausência de estruturação entre populações separadas por uma grande cadeia de montanhas, relatada como uma grande barreira para espécies de vertebrados. A grande capacidade de dispersão da espécie por balonismo é apontada como principal responsável pelos padrões observados (Lee *et al*, 2004), já que quando coletada em toda sua área de ocorrência (distâncias de até 6500 quilômetros) não apresenta grande estruturação genética, mesmo entre populações muito distantes. A área de coleta – Sul e Leste da Ásia, Filipinas e Austrália – é uma região que está sob constante influência de monções, caracterizadas por chuva intensa e vento constante que devem exercer uma ação homogeneizadora nas populações de espécies que realizam dispersão aérea (Su *et al*, 2007).

Em *N. clavipes*, é possível observar boa manutenção de fluxo gênico em distâncias baixas e moderadas, com pouca ou nenhuma estruturação genética entre as populações. Com o

aumento da distância, a estruturação também é maior – o que pode ser atribuído à distância geográfica e também à presença de matriz entre os fragmentos. A ausência de fortes ventos, como as monções do sudeste asiático, também pode promover a maior estruturação observada em *N. clavipes* em relação a outras espécies de *Nephila*.

5.3. Efeito da distância geográfica

A distância geográfica entre duas populações pode afetar de maneiras muito diferentes a estruturação genética de uma espécie. Além da distância em si, é preciso levar em conta a capacidade de dispersão do indivíduo e as propriedades da matriz que separa essas populações (Pütz *et al*, 2011). Em aranhas, mesmo espécies que realizam dispersão por balonismo podem apresentar queda na viabilidade de metapopulações devido ao decréscimo de fluxo gênico em populações separadas por apenas 10 quilômetros (Reed *et al*, 2011). Outras espécies, entretanto, apresentam padrões de estruturação genética que não necessariamente concordam com a distribuição geográfica dos indivíduos; tal estruturação, então, é explicada por outros motivos que não o isolamento por distância (Croucher *et al*, 2011).

Os resultados obtidos indicam que o isolamento por distância não é grande responsável pela estruturação genética apresentada. Foram realizados testes de Mantel separados para os três grupos utilizados na AMOVA (São Paulo; Minas Gerais; Sul), a fim de verificar a possibilidade de que o isolamento por distância existisse em baixa e média escala. Os três testes não foram significativos (SP: $p=0,129$; MG: $p=0,331$; Sul: $p=0,666$), demonstrando que mesmo em menor escala, não existe correlação entre distância genética e distância geográfica.

No Estado de São Paulo, a estruturação genética foi muito inferior do que a encontrada no geral. Dos 36 valores de F_{ST} obtidos para as comparações par-a-par das 9 populações, apenas quatro foram significativos (tabela 5). Além disso, os valores significativos são considerados moderados. As distâncias geográficas entre as populações paulistas foram de 3 a 165 e os resultados indicam que distâncias dessa ordem de grandeza (microescala geográfica) permitem fluxo gênico considerável entre as populações de *N. clavipes*. A comparação entre os valores das populações de Minas Gerais gera padrão parecido: dos três valores, um não é significativo e corresponde ao par de populações geograficamente mais próximas.

A falta de estruturação genética em distâncias baixas e moderadas é esperada para *N. clavipes*, uma vez que as espécies desse gênero são consideradas boas dispersoras (Kuntner & Agnarsson, 2011a; Kuntner & Agnarsson, 2011b). Embora ainda não tenha sido demonstrada, a possibilidade das aranhas do gênero realizarem dispersão por balonismo é muito grande (Su *et al*, 2007; Kuntner & Agnarsson, 2011b).

Outras espécies de *Nephila*, como *N. pilipes*, apresentam baixa estruturação mesmo entre populações separadas por 6.500 quilômetros (Su *et al*, 2007). Para *N. clavipes*, não foi encontrado um padrão de correlação entre as distâncias genética e geográfica.

Uma possibilidade para explicar a estruturação apresentada por populações de aranhas é a dispersão por agentes, incluindo antrópicos. Aranhas do gênero *Selenops* habitam o Caribe continental e apresentam dispersão por balonismo. São frequentemente encontradas em plantações, locais próximos a habitações, utilizando como abrigos pedras e blocos de concreto. Nessa espécie, Crews *et al* (2010) encontraram forte estruturação genética não correlacionada com a distância geográfica, haplótipos muito parecidos amplamente, e haplótipos próximos em populações muito distantes. Esse conjunto levou os autores a indicar a dispersão por vetores, especialmente antrópicos, como a hipótese *post hoc* mais indicada para explicar os padrões observados. Embora não seja sinantrópica como outras espécies da mesma família, *N. clavipes* é frequentemente encontrada na beira de estradas, trilhas ou mesmo em vegetação próxima a ocupações humanas (Rypstra, 1985). Assim como em *Selenops spp.*, alguns haplótipos são amplamente distribuídos por centenas de quilômetros, enquanto que alguns haplótipos muito relacionados são encontrados separados por grandes distâncias. Assim, a dispersão por vetores pode ser possível em *N. clavipes*, embora as diferenças genéticas entre os clados possam representar divergências presentes antes da intervenção humana.

A dispersão diferencial de machos e fêmeas pode resultar em altos valores de F_{ST} para marcadores mitocondriais. Como a herança é uniparental, apenas os haplótipos presentes nas fêmeas serão passados para as próximas gerações. Dessa maneira, se fêmeas possuem dispersão restrita, a capacidade de dispersão do marcador fica limitada (Croucher *et al*, 2011). Os machos de *N. clavipes* não constituem teia própria na idade adulta; vivem como comensais nas teias das fêmeas, e são capazes de percorrer várias teias até encontrar uma fêmea que esteja disponível para o acasalamento (Moore, 1977; Rittschof, 2010). Em outras espécies de aranhas, esse cenário é suficiente para o estabelecimento de divergências substanciais entre populações próximas, mesmo na ausência de barreiras visíveis ao fluxo gênico (Cooper *et al*, 2011).

Em *N. clavipes*, ao analisarmos apenas as fêmeas, o valor geral de F_{ST} apresentou ligeira queda (de 0,30178 para 0,28982) não significativa (intervalos de confiança se sobrepõem). Portanto, não foi detectado um efeito significativo exercido pelos machos na manutenção de fluxo gênico na macroescala analisada.

Na microescala, a exclusão dos machos representou um aumento no valor geral de F_{ST} (de 0,02996 para 0,05163). Entretanto, os intervalos de confiança 95% desses valores também se sobrepõem. Dessa forma, mesmo com o aumento de valor, nossos dados não permitem afirmar que os machos sejam capazes de uma maior manutenção de fluxo gênico entre populações próximas. Apesar de não significativos, os dados apontam uma tendência interessante, que merece investigações mais detalhadas. Uma maior coleta de indivíduos machos, além de análises com marcadores nucleares são sugeridas para a investigação dos efeitos da dispersão diferencial entre os sexos nos padrões de fluxo gênico de *N. clavipes*.

5.4. Relações filogeográficas e estimativas de divergência

As árvores bayesiana (figura 9), de máxima verossimilhança (figura 8) e a rede de haplótipos (figura 6) apresentam os mesmos três clados: clado 1 composto por indivíduos de 14 populações, que apresenta dois haplótipos bastante frequentes e muito bem distribuídos nas populações; clado 2 composto predominantemente por indivíduos das populações de Minas Gerais; clado 3, composto por indivíduos de 14 populações, e que apresenta o haplótipo mais frequente, presente em 130 indivíduos, também muito bem distribuído pelas populações..

A presença de grupos genéticos distintos foi relatada para diversos organismos que habitam a Mata Atlântica. Anuros do gênero *Hypsiboas* apresentam pelo menos três grupos genéticos, relacionados com a ocorrência geográfica dos indivíduos – um grupo na região Norte, um na região Central e um na região Sul da Mata Atlântica (Carnaval *et al*, 2009). Esse mesmo padrão é encontrado para as aves *Sclerurus scansor* (D’Horta *et al*, 2011). *Xyphorhynchus fuscus* e *Conopophaga lineata*, duas aves típicas da Mata Atlântica, dois grupos genéticos (Cabanne *et al*, 2007; Pessoa, 2008). Diversos trabalhos apontam a região entre o norte do Estado de São Paulo e o sul do Estado de Minas Gerais como uma zona de contato secundário entre linhagens gênicas isoladas (D’Horta *et al*, 2011; Pessoa, 2008).

Em *N. clavipes*, os três grupos geográficos encontrados na AMOVA possuem características bastante diferentes quanto a índices de diversidade e composição das populações. No entanto, os grupos geográficos não correspondem totalmente aos clados filogenéticos: o clado 2, composto majoritariamente por indivíduos das populações de Minas Gerais, é o que mais concorda com a ocorrência geográfica, enquanto que os clados 1 e 3 são compostos por indivíduos amostrados em toda a área de coleta. A presença de indivíduos dos clados 1 e 3 nas populações de Minas Gerais, assim como a presença de indivíduos pertencentes ao clado 2 na população de Rio Claro/SP pode ser um indício de que a região entre o Norte do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais possa ser, também para *N. clavipes*, uma zona de contato secundário entre linhagens distintas. Essa hipótese é reforçada pelos indícios de expansão populacional dos clados 1 e 3, de acordo com os testes de neutralidade. Além disso, a dispersão por agentes pode explicar, em parte, a grande distribuição geográfica encontrada nos clados 1 e 3.

As estimativas de divergência entre espécies de *Nephila* apontam para o Mioceno médio e tardio e Plioceno, onde alterações cíclicas na temperatura média global podem ter provocado grandes ondas de especiação. As espécies americanas do gênero *Nephila* (*N. clavipes* e *N. sexpunctata*) tem como grupo mais próximo as espécies africanas, tais como *N. inaurata* e *N. senegalensis*, e apresentam posição derivada em relação a estas últimas, sendo a área ancestral desse clado localizada na África (Su *et al*, 2011). A separação entre as espécies americanas e africanas é estimada entre o Mioceno tardio e o Plioceno (de 8 a 2 milhões de anos atrás – Su *et al*, 2011). A estimativa de divergência obtida nesse estudo entre as sequências de *N. clavipes* e

as sequências de *N. inaurata* e *N. senegalensis* depositadas no GeneBank foram em torno de 4 milhões de anos, com 95% de probabilidade entre 5,2 e 2,8 milhões de anos, durante o Plioceno.

Em *N. clavipes*, a primeira divergência entre os clados genéticos encontrados foi estimada em cerca de 680 mil anos (IC95%: 955 a 405 mil anos). Divergências posteriores foram estimadas entre 540 e 510 mil anos (IC95%: 771 a 300 mil anos), durante o Pleistoceno.

O Pleistoceno é marcado por alternância entre períodos quentes e períodos frios, com transições muito curtas entre eles (Dansgaard *et al*, 1993). Nessas situações, as grandes florestas tropicais podem ter apresentado contração em seu tamanho original, ficando restritas a manchas isoladas por matriz de vegetação aberta (Brown & Ab'Saber, 1979; Haffer & Prance, 2001).

Na Mata Atlântica, ainda são poucos os trabalhos que evidenciem os efeitos das flutuações climáticas do Pleistoceno na estruturação genética de populações. Estudos com grupos de vertebrados, em especial anuros e aves, indicam resultados concordantes com o padrão previsto de diversificação no Pleistoceno. Espécies que apresentam divisão em grupos genéticos, frequentemente apresentam divergência entre esses grupos datadas do Pleistoceno. As populações do Sul costumam apresentar menores índices de diversidade e indicam eventos de expansão recente (Cabanne *et al*, 2007; Carnaval *et al*, 2009; D'Horta *et al*, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos para alguns grupos de plantas, com a existência de ao menos dois grupos de haplótipos para a Mata Atlântica e uma divisão evidente na porção central do bioma, além de expansão das populações da região Sul (Turchetto-Zolet *et al*, 2012; Palma-Silva *et al*, 2009).

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam padrão concordante com o descrito para outros grupos estudados na Mata Atlântica. Dessa forma, nossos dados apontam que as oscilações climáticas características do Pleistoceno podem ter sido importantes para a ocorrência de eventos de divergência não apenas para vertebrados, como também para invertebrados. Nosso estudo com *N. clavipes* é o primeiro que temos notícia a apontar um animal invertebrado apresentando padrões filogeográficos semelhantes aos de outros organismos previamente estudados na Mata Atlântica.

6. Conclusões

Nephila clavipes apresentou-se como um modelo adequado para estudo, por ser de fácil identificação e captura. Além disso, apresenta níveis de variabilidade adequados para a discriminação entre indivíduos e entre grupos genéticos.

Os padrões de diversidade encontrados foram semelhantes aos obtidos por estudos com outras espécies do gênero *Nephila*: baixa divergência entre indivíduos separados por grandes distâncias. Os índices de diversidade intrapopulacionais não apresentaram correlação significativa com o tamanho do fragmento em que cada população estava presente.

Entre as populações foi detectada uma forte estruturação genética, indicando fluxo gênico reduzido entre populações separadas por grandes distâncias. Em distâncias baixas ou moderadas, os padrões de estruturação foram baixos ou ausentes, indicando manutenção de fluxo gênico nessas distâncias.

Foram encontrados três clados genéticos distintos para *N. clavipes* na Mata Atlântica. Esses clados, entretanto, não apresentaram claras relações com a localização geográfica dos indivíduos, sendo o clado 2 o mais próximo de ser uma linhagem geográfica.

A divergência estimada entre *N. clavipes* e as espécies africanas de *Nephila* foi coerente com o estimado por trabalhos anteriores (entre o Mioceno e o Plioceno).

As populações do Sul apresentaram forte sinal de expansão recente.

As linhagens genéticas foram datadas no Pleistoceno, indicando que as flutuações climáticas desse período podem ter causado eventos de divergência intraespecífica.

Este estudo apresenta uma espécie de invertebrado com padrões filogeográficos concordantes com os encontrados em organismos de outros grupos, indicando que processos em comum podem ter atuado na diversificação de espécies da Mata Atlântica.

7. Referências

- Álvarez-Padilla, F., Dimitrov, D., Giribet, G., & Hormiga, G. (2009). Phylogenetic relationships of the spider family Tetragnathidae (Araneae, Araneoidea) based on morphological and DNA sequence data. *Cladistics*, 25(2), 109–146.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., and Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history, and evolution* (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1), 3–15.
- Bandelt H. J., Forster P, Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48. Disponível em <http://www.fluxus-engineering.com/>.
- Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 491(83), 481–491.
- Beavis, A. S., Sunnucks, P., & Rowell, D. M. (2011). Microhabitat preferences drive phylogeographic disparities in two Australian funnel web spiders. *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(4), 805–819.
- Bell, J. R., Bohan, D. A., Shaw, E. M., & Weyman, G. S. (2007). Ballooning dispersal using silk: world fauna, phylogenies, genetics and models. *Bulletin of Entomological Research*, 95(02), 69–114.
- Benati K.R., Souza-Alves J.P., Silva E.A., Peres M.C..L, Coutinho E.O. (2005). *Aspectos comparativos das comunidades de aranhas (Araneae) em dois remanescentes de Mata Atlântica da Bahia, Brasil*. Biota Neotropica, 5.
- Blamires, S. J., Lee, Y.-H., Chang, C.-M., Lin, I.-T., Chen, J.-A., Lin, T.-Y., & Tso, I.-M. (2010). Multiple structures interactively influence prey capture efficiency in spider orb webs. *Animal Behaviour*, 80(6), 947–953.
- Bond, J.E., Hedin, M.C., Ramirez, M.G., Opell, B.D. (2001). Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology*, 10, 899–910.
- Brescovit, A. D. (1999). Araneae. In C. R. F. Brandão & 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, R. C. A. (2004). *Aracnídeos da Estação Ecológica Jureia-Itatins: Inventário preliminar e história natural*, 198-221. Ribeirão Preto:Holos.
- Brito, P. H., & Edwards, S. V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135(3), 439–55.
- 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 of the United States of America*, 91(14), 6491–5.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1967–71.
- Brown, K.S. & Ab'Saber, A.N. (1979). Ice-age forest refuges and evolution in Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with biological endemism. *Paleoclimas*, 5, 1–30.
- Brown Jr., K. S. & Brown, G. G. (1992). Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In T. C. Whitmore and J. A. Sayer (Eds.), *Tropical deforestation and species extinction*, 119-142. Londres: Chapman and Hall.
- Brusca, R.C. & Brusca, G.J. (2011). *Invertebrados*. 2a. ed. Guanabara Koogan Editora. Rio de Janeiro/RJ. Brasil.
- Cabanne, G. S., Santos, F. R., & Miyaki, C. Y. (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), 73–84.
- Câmara, I. de G. (2003). Brief history of conservation in the Atlantic Forest. Pages 31–42 in C. Galindo-Leal and I. de G. Câmara, editors. *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington , D.C.
- Carnaval, A. C., & Moritz, C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35(7), 1187–1201.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., & Haddad, C. F. B. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science Reports*, 323, 785–789.
- Caterino, M. S., Cho, S., & Sperling, F. A. H. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, (45), 1–54.

- Colgan, D. J., Brown, S., Major, R. E., Christie, F., Gray, M. R., Cassis, G. (2002). Population genetics of wolf spiders of fragmented habitat in the wheat belt of New South Wales. *Molecular Ecology* 11, 2295-2305.
- Cooper, S. J. B., Harvey, M. S., Saint, K. M., & Main, B. Y. (2011). Deep phylogeographic structuring of populations of the trapdoor spider *Moggridgea tingle* (Migidae) from southwestern Australia: evidence for long-term refugia within refugia. *Molecular ecology*, 20(15), 3219–36.
- Cooper, S. J.B., Ibrahim, K. M., & Hewitt, G. M. (1995). Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular ecology*, 4(1), 49–60.
- Crews, S. C., Puente-Rolón, A. R., Rutstein, E., & Gillespie, R. G. (2010). A comparison of populations of island and adjacent mainland species of Caribbean *Selenops* (Araneae: Selenopidae) spiders. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(3), 970–83.
- Croucher, P. J. P., Oxford, G. S., & Gillespie, R. G. (2011). Population structure and dispersal in a patchy landscape: nuclear and mitochondrial markers reveal area effects in the spider *Theridion californicum* (Araneae: Theridiidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(3), 600–620.
- Dansgaard, W., Johnsen, S. J., Clausen, H. B., Dahl-Jensen, D., Gundestrup, N. S., Hammer, C. U., Hvidberg, C. S., et al. (1990). Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Letters to Nature*, 364, 8–10.
- Dantas, G. P. M., Cabanne, G. S., & Santos, F. R. (2011). How Past Vicariant Events Can Explain the Atlantic Forest Biodiversity? in: *Ecosystems Biodiversity*. Intech. 429–438.
- D’Horta, F. M., Cabanne, G. S., Meyer, D., & Miyaki, C. Y. (2011). The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular ecology*, 20(9), 1923–35.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution*.
- Dixo, M., 2005. Diversidade de sapos e lagartos de serrapilheira numa paisagem fragmentada do Planalto Atlântico de São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Dixo, M., Metzger, J. P., Morgante, J. S., & Zamudio, K. R. (2009). Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, 142(8), 1560–1569.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.

FigTree, disponível no site <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Foelix, R. F. (1996). *Biology of Spiders*. New York: Oxford University Press.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–9.

Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (2010). *Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica Período 2008-2010*. São Paulo, SP.

Gerber, A. S., Loggins, R., Kumar, S., & Dowling, T. E. (2001). Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Annual Review of Genetics*, (35), 539–66.

Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carrol, S.B. (2011). *Introdução a Genética*. 9a. ed. Guanabara Koogan Editora. Rio de Janeiro/RJ. Brasil.

Groeneveld, J., Alves, L. F., Bernacci, L. C., Catharino, E.L.M., Knogge, C., Metzger, J.P., Pütz, S., Huth, A. (2009). The impact of fragmentation and density regulation on forest succession in the atlantic rain forest. *Ecological Modelling*. 220 (19), 2450-2459.

Guan, J., Porter, D., & Vollrath, F. (2012). Silks cope with stress by tuning their mechanical properties under load. *Polymer*, 53(13), 2717–2726.

Haffer, J. & Prance, G.T. (2001) Climatic forcing in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, 16, 579–607.

Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in ecology & evolution*, 4(1), 6–11.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14812–7.

Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907–13.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (1993). *Mapa de vegetação do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE.

Indicatti, R.P., Candiani, D.F., Brescovit, A.D., Japyassú, H.F. (2005) Diversidade de aranhas de solo (Arachnida: Araneae) na bacia do Reservatório do Guarapiranga,

São Paulo, São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 5. Disponível: <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n1a/pt/abstract?inventory+BN011051a2005>

- Johansson, M., Primmer, C. R., & Merilä, J. (2007). Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular ecology*, 16(13), 2693–700.
- Hodge, M. A., Uetz, G. W., Sciences, B., & A, O. U. S. (1992). Antipredator benefits of single- and mixed-species grouping by *Nephila clavipes* (L.) (Araneae, Tetragnathidae). *The Journal of Arachnology*, 20, 212–216.
- Kimmer Jr., D. L., & Grant, C. T. (1980). Attitude change of *Nephila clavipes* spiderlings (Araneae: Araneidae) during communal life. *The Journal of Arachnology*, 8, 53–58.
- Kuntner, M. (2005). A revision of *Herennia* (Araneae, Nephilidae, Nephilinae), the Australasian ‘coin spiders’. *Invertebrate Systematics*, 19, 391–436.
- Kuntner, M. (2006). Phylogenetic systematics of the Gondwanan nephilid spider lineage Clitaetrinae (Araneae, Nephilidae). *Zoologica Scripta*, 35(1), 19–62.
- Kuntner, M. (2007). A monograph of *Nephilengys*, the pantropical “hermit spiders” (Araneae, Nephilidae, Nephilinae). *Systematic Entomology*, 32, 95–135.
- Kuntner, M., Coddington, J. A., & Hormiga, G. (2008). Phylogeny of extant nephilid orb-weaving spiders (Araneae, Nephilidae): testing morphological and ethological homologies. *Cladistics*, 24, 147–217.
- Kuntner, M., & Coddington, J. A. (2009). Discovery of the largest orbweaving spider species: the evolution of gigantism in *Nephila*. *PloS one*, 4(10), e7516.
- Kuntner, M., & Agnarsson, I. (2011a). Phylogeography of a successful aerial disperser: the golden orb spider *Nephila* on Indian Ocean islands. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 119.
- Kuntner, M., & Agnarsson, I. (2011b). Biogeography and diversification of hermit spiders on Indian Ocean islands (Nephilidae: *Nephilengys*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 59(2), 477–88.
- Lee, J., Jiang, L., Su, Y., & Tso, I. (2004). Is Central Mountain Range a Geographic Barrier to the Giant Wood Spider *Nephila pilipes* (Araneae: Tetragnathidae) in Taiwan? A population genetic approach. *Zoological Studies*, 43(1), 112–122.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Marshall, S. D., Walker, S. E., Rypstra, A. L. (2006). Two ecologically-divergent generalist predators have different responses to landscape fragmentation. *Oikos* 114 (2), 241-248.

- Michalik, P., & Rittschof, C. C. (2011). A comparative analysis of the morphology and evolution of permanent sperm depletion in spiders. *PloS one*, 6(1), e16014.
- Ministério do Meio Ambiente. (1999). *Diretrizes para a política de conservação e desenvolvimento sustentável da Mata Atlântica*. Caderno no 13. Brasília, DF, Brasil.
- Mittermeier, R. A., Myers, N., Robles Gil, P. and Mittermeier, C. G. (1999). *Hotspots*. Mexico City: Agrupación Sierra Madre, CEMEX.
- Mittermeier, R. A., Da Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., & Brandon, K. (2005). A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, 19(3), 601–607.
- Moore, C. W. (1977). The Life Cycle , Habitat and Variation in Selected Web Parameters in the Spider, *Nephila clavipes* Koch (Araneidae). *American Midland Naturalist*, 98(1), 95–108.
- Moore, W. S. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49, 718–726.
- Moisenovich, M. M., Pustovalova, O., Shackelford, J., Vasiljeva, T. V, Druzhinina, T. V, Kamenchuk, Y. A, Guzeev, V. V, Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debabov, V. G., Kirpichnikov, M. P., Agapov, P. P. (2012). Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. *Biomaterials*, 33(15), 3887–98.
- Morellato, L. P. C., & Haddad, C. F. B. (2000). Introduction□: The Brazilian Atlantic Forest. in *Biotropica*, 32(4b), 786–792.
- Moritz, C., Richardson, K.S., Ferrier, S., Monteith, G.B., Stanisić, J., Williams, S.E., Whiffin, T. (2001). Biogeographical concordance and efficiency of taxon indicators for establishing conservation priority in a tropical rainforest biota. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 268, 1875–1881.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G.M., Barbara, T., Bered, F., Bodanese-Zanettini, M.H., (2009). Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* 103, 503–512.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Harris, D. J., Yonenaga-Yassuda, Y., & Sites, J. W. (2011). Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(2), 446–59.
- Pessoa, R. O. (2008). Sistemática e Biogeografia Histórica da Família Conopophagidae (Aves: Passeriformes): Especiação nas Florestas da América do Sul. *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.*, (São Paulo/SP. Brasil.).

- Platinick, N. I. (2012). The world spider catalog. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
- Pütz, S., Groeneveld, J., Alves, L. F., Metzger, J. P., Huth, A. (2011). Fragmentation drives tropical forest fragments to early successional states: a modelling study for brazilian atlantic forests. *Ecological Modelling* 222, 1986-1997.
- Rambaut, A., Drummond, A. J. (2007). Tracer v1.4, Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramirez, M. G. & Fandino, L. B. (1996). Genetic variability and gene flow in *Metepeira ventura* (Araneae, Araneidae). *Journal of Arachnology* 24, 1-8.
- Ramirez, M. G. & Haakonsen, K. E. (1999). Gene flow among habitat patches on a fragmented landscape in the spider *Argiope trifasciata* (Araneae: Araneidae). *Heredity* 83, 580-585.
- Reed, D. H., Teoh, V.-H., Stratton, G. E., & Hataway, R. a. (2009). Levels of gene flow among populations of a wolf spider in a recently fragmented habitat: current versus historical rates. *Conservation Genetics*, 12(1), 331–335.
- Resende, H. C., Yotoko, K. S. C., Delabie, J. H. C., Costa, M. A., Campiolo, S., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101(4), 949–960.
- Richter, S.C., Crother, B. I., Broughton, R. E. (2009). Genetic Consequences of Population Reduction and Geographic Isolation in the Critically Endangered Frog, *Rana sevosia*. *Copeia* 4: 799-806.
- Rittschof, C. C., & Ruggles, K. V. (2010). The complexity of site quality: multiple factors affect web tenure in an orb-web spider. *Animal Behaviour*, 79(5), 1147–1155.
- Rittschof, C. C. (2010). Male density affects large-male advantage in the golden silk spider, *Nephila clavipes*. *Behavioral Ecology*, 21(5), 979–985.
- Rix, M. G., & Harvey, M. S. (2012). Phylogeny and historical biogeography of ancient assassin spiders (Araneae: Archaeidae) in the Australian mesic zone: evidence for Miocene speciation within Tertiary refugia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(1), 375–96.
- Robinson, M. H., & Mirick, H. (1971). The predatory behavior of the golden-web spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae). *Psyche*, 78(3), 123–139.
- Robinson, E. A., Blagoev, G. A., Hebert, P. D. N., & Adamowicz, S. J. (2009). Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, 16, 27–46.

- Rypstra, A. L. (1985). Aggregations of *Nephila clavipes* (L.) (Araneae, Araneidae) in Relation to Prey Availability. *Journal of Arachnology*, 13(1), 71–78.
- Santucci, F., Emerson, B. C., & Hewitt, G. M. (1998). Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular ecology*, 7(9), 1163–72.
- Steven, E., Jobiliong, E., Eugenio, P. M., & Brooks, J. S. (2012). Note: adhesive stamp electrodes using spider silk masks for electronic transport measurements of supra-micron sized samples. *The Review of scientific instruments*, 83(4), 046106.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (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(6), 651–701.
- StatSoft, Inc. (2011). Electronic Statistics Textbook: Nonparametric Statistics. Retrieved from <http://www.statsoft.com/textbook/nonparametric-statistics/>
- Su, Y.-C., Chang, Y.-H., Lee, S.-C., & Tso, I.-M. (2007). Phylogeography of the giant wood spider (*Nephila pilipes*, Araneae) from Asian-Australian regions. *Journal of Biogeography*, 34(1), 177–191.
- Su, Y.-C., Chang, Y.-H., Smith, D., Zhu, M.-S., Kuntner, M., & Tso, I.-M. (2011). Biogeography and speciation patterns of the golden orb spider genus *Nephila* (Araneae: Nephilidae) in Asia. *Zoological science*, 28(1), 47–55.
- Svenning, J.-C., & Skov, F. (2004). Limited filling of the potential range in European tree species. *Ecology Letters*, 7(7), 565–573.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera Jr., F. A., & Alexandrino, J. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and evolution*, 55(1), 1018–1031.
- Toti, D.S., Coyle, F.A., Miller, J.A. (2000) A structured inventory of appalachian grass bald and heath bald spider assemblages and a test of species richness estimator performance. *Journal of Arachnology*, 28, 329–345.
- Tso, I.-M., Tai, P.-L., Ku, T.-H., Kuo, C.-H., & Yang, E.-C. (2002). Colour-associated foraging success and population genetic structure in a sit-and-wait predator *Nephila maculata* (Araneae: Tetragnathidae). *Animal Behaviour*, 63(1), 175–182.

- Turchetto-Zolet, A. C., Cruz, F., Vendramin, G. G., Simon, M. F., Salgueiro, F., Margis-Pinheiro, M., & Margis, R. (2012). Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 65(1), 174–82.
- Vianna, M. J. B. (1972). Contribuição à biologia de *Nephila clavipes* (L., 1767). (Araneae, Araneidae). Tese de Doutorado. UNESP. Botucatu.
- Wright, Sewall (1984). Evolution and the Genetics of Populations: Genetics and Biometric Foundations v. 4 (Variability within and Among Natural Populations); New Edition. University of Chicago Press.
- Zellmer, A. J., Knowles, L. L. (2009). Disentangling the effects of historic vs. contemporary landscape structure on population genetic divergence. *Molecular Ecology*, 18: 3593-3602.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12, 563–584.
- Zink, R.M., Barrowclough, G.F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17:2107–2121.

Anexos

Tabela 1: Tamanho dos fragmentos onde foram coletadas as populações.

População	Tamanho (ha)	Tamanho ($\log_2$)
Santa Genebra	251,77	7,97596
Parque Ecológico	110	6,78136
Parque Hermógenes	13,44	3,74846
Sousas	50	5,64386
Observatório	100	6,64386
Serra do Japi	20.000	14,28771
Porto Feliz	50	5,64386
Rio Claro	2.230	11,12283
Descalvado	62,73	5,97108
Foz do Iguaçu	185.262	17,49921
Ibirama	570,58	9,15628
Sapiranga	12,24	3,61353
Juiz de Fora	134,68	7,07339
Viçosa	1611,29	10,654
Belo Horizonte	114,3	6,83669

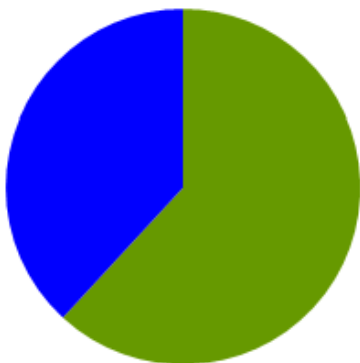
Tabela 2: Número de indivíduos por haplótipo, por população. 1 – Santa Genebra; 2 – Parque Ecológico; 3 – Parque Hermógenes; 4 – Sousas; 5 – Observatório; 6 – Serra do Japi; 7 – Porto Feliz; 8 – Rio Claro; 9 – Descalvado; 10 –

	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hap1	130	12	12	4	11	9	9	14	8	10	26	9	-	5	1	-
Hap2	44	5	-	1	4	4	1	4	6	7	1	-	11	-	-	-
Hap3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Hap4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Hap5	28	1	3	5	2	5	2	6	1	2	1	-	-	-	-	-
Hap6	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap7	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap8	6	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	1	-	-
Hap9	4	-	1	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Hap10	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap11	3	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap12	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Hap13	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	5
Hap14	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	12	5
Hap15	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hap16	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap17	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Hap18	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1
Hap19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap20	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	1
Hap21	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
Hap22	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap23	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2	-
Hap24	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap25	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap26	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap27	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Hap28	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap29	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap30	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap31	10	6	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap32	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap33	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap34	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap35	2	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap36	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap37	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap38	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap39	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap40	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap41	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Hap42	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Hap43	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap44	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap45	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap46	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Foz do Iguaçu; 11 – Ibirama; 12 – Sapiroanga; 13 – Juiz de Fora; 14 – Viçosa; 15 – Belo Horizonte.

Figura 1, a – o: Proporção dos indivíduos de cada clado presentes em cada população. Clado 1, azul; clado 2, verde; clado 3, vermelho.

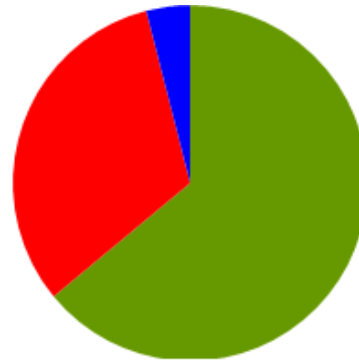
a) Belo Horizonte



b) Viçosa



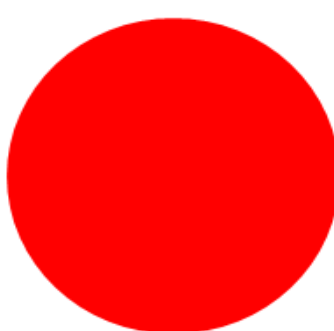
c) Juiz de Fora



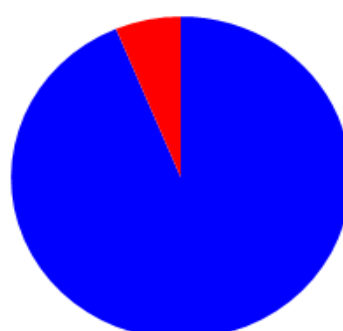
d) Foz do Iguaçu



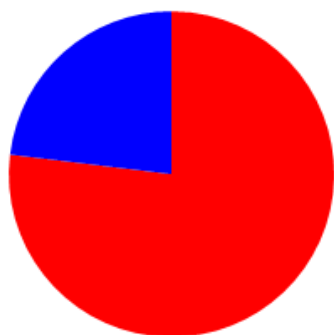
e) Ibirama



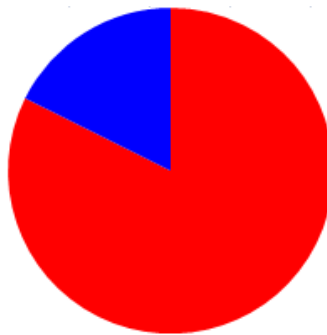
f) Sapiranga



g) Santa Genebra



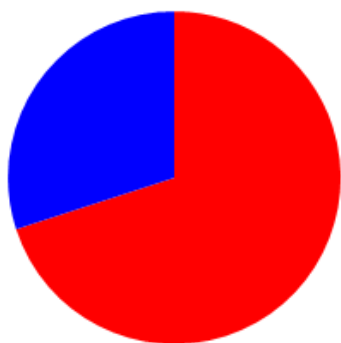
h) Parque Ecológico



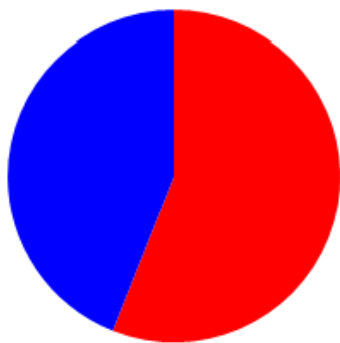
i) Parque Hermógenes



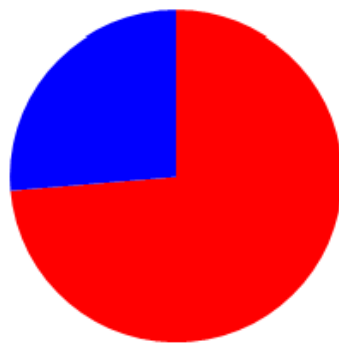
j) Sousas



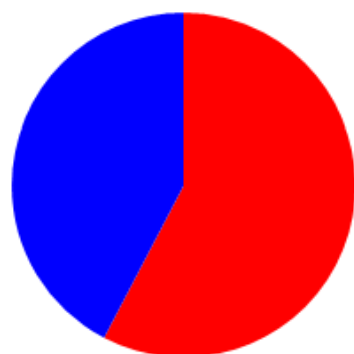
k) Observatório



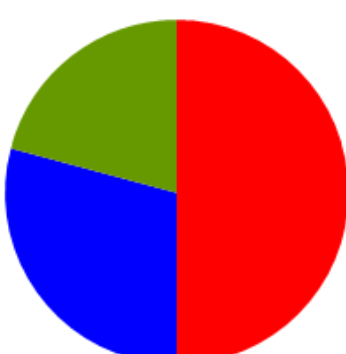
l) Serra do Japi



m) Porto Feliz



n) Rio Claro



o) Descalvado

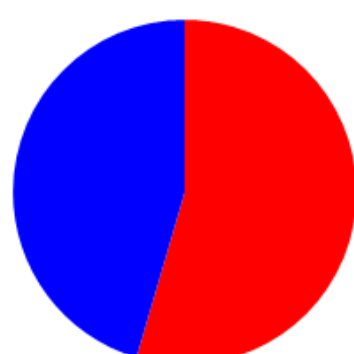


Tabela 3: Distância genética média entre as populações, em porcentagem de divergência (à direita: desvio padrão). 1 – Foz do Iguaçu; 2 – Porto Feliz; 3 – Rio Claro; 4 – Alta Floresta; 5 – Belo Horizonte; 6 – Viçosa; 7 – Parque Hermógenes; 8 – Sapiiranga; 9 – Serra do Japi; 10 – Observatório; 11 – Descalvado; 12 – Ibirama; 13 – Sosas; 14 – Parque Ecológico; 15 – Santa Genebra; 16 – Juiz de Fora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,001	0,002	0,002	0,000	0,002	0,001	0,001	0,003
2	0,004		0,003	0,003	0,003	0,004	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003
3	0,006	0,007		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003
4	0,012	0,012	0,012		0,002	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003
5	0,010	0,01	0,01	0,011		0,002	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,002
6	0,011	0,011	0,011	0,011	0,009		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003
7	0,005	0,005	0,007	0,012	0,01	0,011		0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003
8	0,01	0,007	0,009	0,014	0,011	0,013	0,007		0,004	0,003	0,003	0,005	0,003	0,004	0,004	0,005
9	0,004	0,006	0,007	0,013	0,011	0,011	0,006	0,009		0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003
10	0,005	0,006	0,007	0,013	0,011	0,012	0,006	0,008	0,006		0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003
11	0,005	0,006	0,007	0,013	0,011	0,012	0,006	0,007	0,006	0,006		0,002	0,002	0,002	0,002	0,004
12	0,001	0,005	0,006	0,012	0,011	0,011	0,005	0,011	0,004	0,005	0,005		0,001	0,001	0,001	0,003
13	0,004	0,005	0,007	0,013	0,011	0,011	0,006	0,008	0,005	0,006	0,006	0,004		0,002	0,002	0,003
14	0,002	0,005	0,006	0,012	0,01	0,011	0,005	0,01	0,004	0,005	0,005	0,002	0,004		0,002	0,003
15	0,003	0,005	0,007	0,013	0,011	0,012	0,006	0,009	0,005	0,006	0,006	0,003	0,005	0,004		0,003
16	0,009	0,01	0,01	0,011	0,009	0,008	0,011	0,014	0,01	0,011	0,011	0,009	0,01	0,009	0,01	

Tabela 4: Distância geográfica entre os pontos de coleta, medidos em km. 1 – Foz do Iguaçu; 2 – Porto Feliz; 3 – Rio Claro; 4 – Alta Floresta; 5 – Belo Horizonte; 6 – Viçosa; 7 – Parque Hermógenes; 8 – Sapiiranga; 9 – Serra do Japi; 10 – Observatório; 11 – Descalvado; 12 – Ibirama; 13 – Sousas; 14 – Parque Ecológico; 15 – Santa Genebra; 16 – Juiz de Fora.

	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1														
2	758													
3	791,04	92,04												
5	1252,54	522,58	465,6											
6	1307,96	553,4	518,87	150,85										
7	817,58	65,8	65,98	456,88	491,16									
8	583,84	790,24	872,75	1294,15	1281,18	853,07								
9	814,94	59,78	110,21	480,55	501,01	48,13	819,34							
10	817,23	60,05	82,74	464,62	493,46	18,41	840,66	29,79						
11	811,29	149,98	58,1	441,07	510,3	116,78	923,25	164,11	134,96					
12	534,47	469,05	552,06	977,1	973,91	531,98	321,05	499,23	519,92	603,68				
13	825,41	70,73	75,67	452,34	484,01	10,45	854,47	42,73	14,19	124,75	533,63			
14	818,52	62,64	77,54	460,84	491,4	12,3	845,71	36,04	6,29	129,04	524,92	8,78		
15	813,86	62,15	65,05	460,56	494,95	3,78	849,82	47,33	18,01	117	528,76	13,15	12,49	
16	1214,61	456,4	437,3	218,68	124,28	398,59	1160,51	400,11	397,51	440,72	586,63	390,17	369,57	402,25