



Biogeografia e genética populacional de aranha (*Dolichothele exilis*) na Diagonal Seca Brasileira

Palavras-Chave: GENÉTICA, BIOGEOGRAFIA, CAATINGA, ARANEAE

Autores/as:

MARIA URSINI ALVES DE LIMA [UNICAMP]

MILLKE JASMINE ARMININI MORALES [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a VERA NISAKA SOLFERINI (orientador/a) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Os Neotrópicos constituem uma região rica em biodiversidade e que é alvo de diferentes estudos na área das ciências biológicas. Dentro da porção brasileira dos neotrópicos temos diversos biomas. Para os fins desta introdução cabe focar apenas na Floresta Amazônica (AM), Floresta Atlântica (FA) e no enclave savânico entre ambas as florestas úmidas: a Diagonal Seca Brasileira (DSB) (CARVALHO, et al. 2010).

O Cerrado ocorre majoritariamente sobre o Planalto Central Brasileiro, entre 500 e 1200 metros de altitude e tem o solo lixiviado, ácido e pobre em nutrientes. A vegetação é caracterizada pela resistência ao fogo, advindo dos incêndios naturais sazonais; as árvores são geralmente baixas, com troncos retorcidos e cobertos por espesso súber; o estrato herbáceo é descontínuo sobre o solo, em tufos; dificilmente são encontradas no Cerrado plantas providas de espinhos e as suas árvores não costumam perder as folhas nas estações mais secas (ROMARIZ et al. 1996). Já a Caatinga é considerada uma floresta estacional; possui índice pluviométrico mais baixo que o Cerrado, ocorre em áreas sem lençol freático (ou muito profundo) e em altitudes mais baixas; as árvores são baixas, frequentemente cobertas por espinhos e perdem as folhas nos períodos secos, formando uma serrapilheira de lenta decomposição; ocorrem cactáceas de grande porte (ROMARIZ et al. 1996). Tanto o Cerrado como a Caatinga são formações tropicais com altas temperaturas o ano todo, solos quentes e com baixa umidade (CARVALHO, et al. 2010).

A DSB forma hoje um corredor diagonal e seco entre AM e FA. Nesse corredor observamos o domínio fitogeográfico Cerrado e a floresta sazonalmente seca Caatinga. A formação da DSB é recente no tempo biogeográfico: ao longo do Paleógeno as florestas Amazônica e Atlântica formavam uma única região florestal. Com o soerguimento dos Andes no início do Neógeno o clima tornou-se mais seco; ao longo do Mioceno a concentração de CO₂ atmosférico sofreu redução drástica, o que prejudicou florestas de grande biomassa,

favorecendo as savanas, como Cerrado, Chaco e Caatinga; somente no início do Pleistoceno, há 2Maa Diagonal Seca Brasileira foi totalmente formada, separando por completo a Floresta Amazônica da Mata Atlântica. Após sua formação, as glaciações do Pleistoceno provocaram ciclos de distensão e encolhimento da DSB, pois há evidências de que as florestas tropicais úmidas se contraem durante períodos glaciais e se distendem nos períodos interglaciais (SOBRAL-SOUZA, et al. 2017) mudando de conformação espacial a cada ciclo climático.

Em virtude de sua origem biogeográfica, a DSB abriga linhagens com diferentes histórias evolutivas relacionadas a estes eventos paleoclimáticos. Por exemplo, muitas linhagens têm sua origem em florestas úmidas tropicais, porém hoje residem na DSB, o que gera perguntas como: “Qual processo evolutivo teria possibilitado a adaptação ao novo ambiente quente e seco?” que é, de certa forma, uma pergunta guia para o presente projeto e de todos os outros desenvolvidos no mesmo laboratório. Willians et al. (2017) Analisou duas espécies de aves *Antilophia*, uma endêmica do Cerrado e outra restrita a enclaves de florestas na Caatinga, por meio do sequenciamento de três regiões mitocondriais e três nucleares. Através de análises estocásticas entre as sequências das populações os resultados mostraram clara diferença genética entre as espécies porém um alto grau de compartilhamento de haplótipos, indicando uma divergência recente e que foi datada pelos pesquisadores, coincidindo com o período de mudanças na DSB no Pleistoceno (WILLIANS et al. 2017).

O grupo Araneae já foi investigado em projetos que sondam as diferentes relações e histórias evolutivas relacionadas à DSB. Em *Nephila clavipes* foram encontradas quatro linhagens no Brasil que divergiram no Pleistoceno, sendo uma exclusiva da AM, outra exclusiva da FA e as outras duas associadas à DSB mas que também se estendem em florestas úmidas adentro, mostrando que os biomas brasileiros não são unidades biogeográficas independentes (BARTOLETI et al. 2020). Em *Sicarius cariri*, endêmica da Caatinga, foram encontradas linhagens com histórias evolutivas distintas e divergência das linhagens foram datadas no Terciário (MAGALHÃES et al. 2014). Essas investigações mostram, dentre outras, que a influência das dinâmicas da DSB é diferente em cada táxon de aranha e que o estudo de genes nucleares e mitocondriais fornecem resultados relevantes.

O gênero *Dolichothele* (Araneae, Mygalomorphae) possui nove espécies distribuídas entre Floresta Amazônica, Mata Atlântica e DSB. A espécie *D. exilis*, modelo do presente projeto, tem uma ampla distribuição na Caatinga, ocorrendo também no Cerrado e na Floresta Atlântica (GUADANUCCI et al. 2003). Trata-se de uma aranha “caranguejeira” com hábitos de toca, sendo que apenas os machos são errantes. Além disso, as populações estão localizadas em diferentes fitofisionomias e ao longo de um grande gradiente latitudinal, o que pode acarretar diferenças genéticas entre as populações.

Os objetivos do estudo foram: realizar revisão bibliográfica, coletas e processos laboratoriais para a obtenção de dados a serem utilizados em estudos de biogeografia de aranhas no Brasil, com foco nas relações evolutivas que envolvem a DSB.

METODOLOGIA:

- **COLETAS**

As coletas no Ceará foram realizadas na RPPN Monte Alegre, localizada na APA da Serra de Aratanha, uma unidade de conservação de mais de 7.000 há (2) de “Caatinga alta”, ou Zona da Mata (Figura 1). Nessa viagem de campo todas as coletas ocorreram em uma propriedade que inclui uma serra e a porção de terra plana adjacente. Foram realizadas coletas durante as manhãs, de 12/2020 a 01/2021 junto a um auxiliar de campo..

As aranhas de interesse apresentam hábitos de toca, construindo pequenas teias, geralmente, embaixo de objetos como troncos e rochas; portanto, esses locais foram os mais buscados durante as coletas. Uma vez encontrada, as aranhas normalmente ficam paradas, o que facilita sua captura. Um pote proporcional ao tamanho do indivíduo era então posicionado à frente deste, que era coagido com uma pinça a adentrar o recipiente. Cada pote foi etiquetado na hora, junto a anotações de características, local, data e observações. Após a captura as aranhas eram transportadas até o local de hospedagem; dentro de cada recipiente foi colocada uma gaze, que deveria ser umedecida todos os dias com uma média de 10 gotas de água. As aranhas foram alimentadas com formigas, larvas de besouros e besouros adultos.

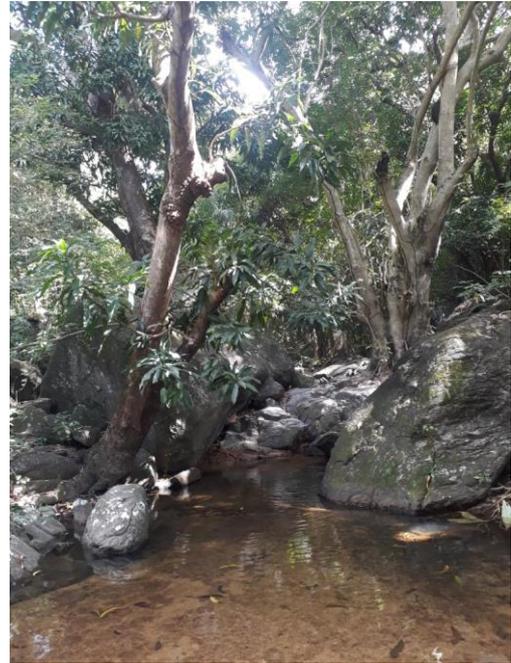


Figura 1 - Vegetação e córrego em cujas pedras foram encontradas aranhas, Serra de Aratanha - CE

• LABORATÓRIO

A extração de DNA foi realizada a partir de tecidos da perna 2 de cada indivíduo, utilizando o kit de extração GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Merck), seguindo as orientações do fabricante.

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas para a amplificação da região COI do DNA mitocondrial. O volume total da reação para cada indivíduo foi de 25µl, sendo 16,5 µl de água ultrapura, 2,5 µl de Tampão 10X, 2,5µl de 25mM MgCl², 0,5 µl de 10mM de Mix dNTP, 0,2 µl (5U) de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,4 µl de cada primer (LCO e HCO) (Folmer et al. 1994) e 2 µl do produto de extração. A reação foi realizada em termociclador nas condições: 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de: 30 seg a 95°C, 30 seg a 50°C e 1 min a 72°C, com extensão final de 10 min a 72°C. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para o sequenciamento foram utilizados os produtos das reações de PCR amplificados, após purificação com a utilização de ExoSAP-IT (Affymetrix) e padronização da concentração para 50 ng/µL. As amostras foram enviadas para a empresa Macrogen Inc services para sequenciamento em sequenciador automático ABI 3500XL (Life Technologies).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 21 espécimes pertencentes à subordem Mygalomorphae, sendo 19 da família Theraphosidae (subfamílias Theraphosinae, Ischnocholinae e Aviculariinae) e um da família Barychelidae. Dentre as aranhas da família Theraphosidae, nove foram identificadas como *Dolichothele cf. exilis*, espécie-alvo do presente trabalho (Tabela 1). A confirmação da identificação da espécie será realizada utilizando o sequenciamento realizado no presente estudo bem como pelo envio dos espécimes preservados em álcool para o taxonomista especialista no gênero.

| Informações sobre os indivíduos analisados | | | | | |
|--|-----------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Espécie | Local de coleta | Data de coleta | Concentração extração de DNA (ng/μL) | Concentração Produto de PCR (ng/μL)* | Resultado eletroforese |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 22/12/20 | 15,062 | 464,87 | Amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 24/12/20 | 25,745 | - | Não amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 01/01/21 | 29,113 | 484,769 | Amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 01/01/21 | 19,207 | - | Não amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 03/01/21 | 17,098 | 385,09 | Amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 03/01/21 | 19,723 | 478,544 | Amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 04/01/21 | 31,701 | 478,144 | Amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 04/01/21 | 22,327 | - | Não amplificado |
| <i>Dolichothele cf. exilis</i> | Pacatuba/CE | 04/01/21 | 20,17 | - | Não amplificado |

O local de coleta está localizado no extremo norte da distribuição da espécie (GUADANUCCI et al. 2011), sendo um sítio importante para a realização de trabalhos sobre sua diversidade e estruturação genética populacional. Além disso, a RPPN Monte Alegre está localizada na Zona da Mata, que possui fitofisionomia distinta das encontradas na Caatinga, bioma em que *D. exilis* está amplamente distribuída. A coleta foi feita durante os meses mais chuvosos, o que pode ter dificultado o trabalho de encontrar os indivíduos pois estes saem de suas tocas, que são passíveis de alagamentos. Porém foi possível identificar diferenças nos locais de coleta, sendo todos espécimes de *D. cf. exilis* encontrados embaixo de rochas com presença de teia, enquanto as demais foram encontradas embaixo ou no interior de troncos em decomposição ou em palhas de bananeiras no interior da mata.

Todas as aranhas identificadas como *Dolichothele cf. exilis* foram processadas no laboratório para a obtenção de sequências de DNA da região mitocondrial COI. A amplificação do COI ocorreu em cinco das nove aranhas analisadas (Tabela 1). O sucesso na amplificação do fragmento de interesse não está relacionado à concentração do DNA extraído, já que indivíduos diferentes com concentrações semelhantes não apresentaram mesmo resultado (Tabela 1). Todas as amostras que amplificaram precisaram ser diluídas para o envio para o sequenciamento, já que as concentrações destas variaram entre 385,09 ng/μl e 484,769 ng/μl e a concentração indicada para o sequenciamento é de 50 ng/μL.

As cinco amostras foram enviadas para sequenciamento juntamente com outras 35 amostras de *Dolichothele exilis*, provenientes de seis localidades diferentes (distribuídas nos

estados do Piauí, Pernambuco e Bahia). Desta forma as análises de variabilidade e estrutura populacional da espécie poderão ser feitas, o que vai permitir fazer inferências acerca de linhagens e evolução através de redes de haplótipos e árvores filogenéticas.

CONCLUSÕES:

Para a construção do projeto, dos relatórios e para a inscrição do presente congresso foi realizada revisão bibliográfica em assuntos referentes à biogeografia da América do Sul, diversidade de aranhas, genética de populações e mecanismos evolutivos relacionados às zonas de transição. Até o momento o trabalho serviu para gerar experiência de coleta de aranhas de toca e observações hábitats e de hábitos de caranguejeiras. As coletas renderam dados que serão utilizados em estudos populacionais de diversas espécies no laboratório, incluindo o presente projeto com a espécie *D. exylis*.

O principal objetivo do projeto é gerar uma árvore de relações filogenética e realizar análises estatísticas de variabilidade. Estes objetivos, todavia, não puderam ser concluídos em virtude do atraso no recebimento dos resultado do sequenciamento. Uma vez que os resultados tenham chegado, tais análises serão performadas e o projeto será concluído.

BIBLIOGRAFIA

BARTOLETI, L. F. Phylogeography of the widespread spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae) in South America indicates geologically and climatically driven lineage diversification. **Journal of Biogeography**, v. 45, 6 Ed., p. 1246-1260, 2020

CARVALHO, Claudio. **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Roca, 2010

FOLMER. O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294-299, 1994.

GUADANUCCI, J. P. L., Cladistic analysis and biogeography of the genus *Oligoxystre* Vellard 1924 (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). **Journal of Arachnology**, v. 39, n. 2, p. 320- 326, 2011.

MAGALHÃES, Ivan. Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*. **Molecular Ecology** v. 23, 21 Ed., p. 5323-5336, 2014

ROMARIZ, Dora de Amarante. **Aspectos da Vegetação do Brasil 2 ED**. São Paulo, Edição da autora, 1996

SOBRAL-SOUZA, Thadeu. De volta ao passado: revisitando a história biogeográfica das florestas tropicais úmidas. **Oecologia Australis**, 21(2): 93-107, 2017

WILLIANS, Leilton. Molecular data and distribution dynamics indicate a recent and incomplete separation of manakins species of the genus *Antilophia* (Aves: Pipridae) in response to Holocene climate change. **Journal of Avian Biology**, v. 48, 8 Ed., p. 1177-1188, 2017