



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA VON HERTWIG MASCARENHAS FONTES

ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES DO
GÊNERO *AGLAOCTENUS* (ARANEAE, LYCOSIDAE)

PHYLOGEOGRAPHICAL ANALYSIS OF TWO *AGLAOCTENUS*
SPECIES (ARANEAE, LYCOSIDAE)

CAMPINAS

2016

FERNANDA VON HERTWIG MASCARENHAS FONTES

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
AGLAOCTENUS (ARANEAE, LYCOSIDAE)**

**PHYLOGEOGRAPHICAL ANALYSIS OF TWO AGLAOCTENUS
SPECIES (ARANEAE, LYCOSIDAE)**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutora em Genética e Biologia
Molecular, na Área de Genética Animal e
Evolução.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor in Genetics and Molecular Biology, in
the area of Animal Genetics and Evolution.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA FERNANDA VON HERTWIG
MASCARENHAS FONTES E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. VERA NISAKA SOLFERINI.

Orientadora: VERA NISAKA SOLFERINI

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/17244-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F737a Fontes, Fernanda Von Hertwig Mascarenhas, 1985-
Análise filogeográfica de duas espécies do gênero *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae) / Fernanda Von Hertwig Mascarenhas Fontes. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Filogeografia. 2. Biogeografia. 3. Aranha. I. Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phylogeographical analysis of two *Aglaoctenus* species (Araneae, Lycosidae)

Palavras-chave em inglês:

Phylogeography

Biogeography

Spiders

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Marcos Roberto Dias Batista

Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Evandro Marsola de Moraes

Fábio Sarubbi Raposo do Amaral

Data de defesa: 22-09-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de setembro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Dr. Marcos Roberto Dias Batista

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Prof. Dr. Fábio Sarubbi Raposo do Amaral

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Ao meu querido pai
Saudades eternas

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, Tatiana e Antonio Fernando (*in memoriam*), pelo carinho e dedicação. Todo o esforço que fizeram foi imprescindível para que eu pudesse concluir mais essa etapa na minha vida. Amo vocês!

Às minhas queridas irmãs e amigas, Tarsilla e Renata, que sempre estiveram ao meu lado.

À minha orientadora, Vera, pela oportunidade e confiança para a realização deste trabalho e pela amizade construída nesses anos de convivência. Em muitos momentos seu apoio me deu força e ânimo para perseverar.

Aos membros das bancas de qualificação, pré-banca e de defesa, Dr. Evando Marsola de Moraes, Dr. Louis Bernard Klaczko, Dr. Marcos Roberto Dias Batista, Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, Dr. Claydson Pinto de Assis, Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin e Dr. Fábio Sarubbi Raposo do Amaral pelas importantes contribuições para o aprimoramento da tese.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento deste projeto de pesquisa e pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Márcio José da Silva pelo sequenciamento das amostras.

À Lourdes e aos demais funcionários do PPG do IB pela prestatividade.

Aos meus amigos do laboratório Elen, Luiz, Jair, Bia, Thadeu, Nat, Lívia, Gustavo, Cecília, Felipe, Fabian, Priscila e Suzana pelo convívio nesses anos de doutorado regados a discussões sobre papers, coletas, análises, conversas, cervejas e risadas. Um dos maiores ganhos que tive nesse período foram esses laços de amizade que espero que durem para sempre.

À Célia, técnica do laboratório, pela grande disposição em ajudar, pelas boas conversas e pelos cafezinhos diários que sempre animaram as minhas manhãs!

Às minhas amigas da graduação PUC-Campinas, em especial, Camila, Marília, Gliciane e Giovana pela nossa grande amizade!

À Lilica, ao Bob e ao Preto, que tornaram todos os meus dias mais felizes.

A todos os meus amigos e familiares que torceram por mim durante essa jornada.

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza!"

João Guimarães Rosa,
Grande Sertão: Veredas

RESUMO

Por sua grande biodiversidade e complexa história geológica, a América do Sul oferece diversas questões a serem abordadas com o uso de filogeografia. O objetivo deste estudo foi testar hipóteses sobre a diversificação biológica na região neotropical, contribuindo para compreender as consequências do estabelecimento de uma área de vegetação aberta na região central do continente que separa suas duas grandes florestas úmidas, a Amazônia e a Atlântica. Para obter diferentes perspectivas acerca desse cenário, estudamos os padrões filogeográficos de duas espécies de aranhas do gênero *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae): *A. lagotis*, distribuída em uma variedade de fitofisionomias, e *A. castaneus*, de distribuição restrita aos biomas florestais, limitadas à região Neotropical da América do Sul. Para ambas realizamos estimativas de diversidade e estrutura genéticas, redes de haplótipos, inferências filogenéticas bayesianas e análises demográficas. Os resultados obtidos estão apresentados em dois manuscritos, correspondentes aos capítulos desta tese. No primeiro capítulo, intitulado “Insights on the Neotropical history provided by a multilocus phylogeographic study of the web spider *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae)”, analisamos 26 populações distribuídas desde a porção leste da Amazônia até o sul da Floresta Atlântica e combinamos o uso de três marcadores nucleares (ITS2, H3 e TIF5A) e um mitocondrial (COI). A diversificação dessa espécie teve início no Plioceno, mas a maior parte da estrutura genética originou-se no Pleistoceno, o que sugere que as oscilações climáticas desse período sejam importantes para este padrão. Os resultados também sugerem eventos distintos entre as porções tropical e subtropical da Floresta Atlântica. No Capítulo 2, “Padrão filogeográfico de *Aglaoctenus castaneus* (Araneae, Lycosidae) entre as Florestas Atlântica e Amazônica”, seis populações foram analisadas usando-se dois marcadores moleculares (COI e ITS2). A grande estruturação entre os dois biomas sugere um papel vicariante para a diagonal seca; no entanto a divergência entre os clados correspondentes às duas florestas é muito posterior ao estabelecimento dessa região savânica, indicando manutenção de fluxo gênico entre populações das florestas até o Quaternário. As linhagens relacionadas a cada bioma também apresentaram estruturação, sugerindo que eventos em escala regional também contribuíram para moldar o atual padrão de diversidade da espécie. Nossos resultados concordam com o consenso geral de que a história dos biomas neotropicais é bastante complexa devido às grandes mudanças orogênicas e climáticas que influenciaram a paisagem da região ao longo do tempo e ressaltam a importância de utilizar diferentes organismos de ampla distribuição para elucidar questões biogeográficas nos Neotrópicos.

ABSTRACT

The great biodiversity and complex geological history of South America offers a number of issues to be addressed with the use of phylogeography. The aim of this study was to test hypotheses about the biological diversity in the Neotropical region, contributing to understand the consequences of the establishment of an open vegetation area in the central region of the continent separating its two large rainforest, the Amazon and the Atlantic. In order to get distinct perspectives about this scenario we studied phylogeographical patterns of two *Aglaoctenus* spiders (Araneae, Lycosidae): *A. lagotis*, distributed in a variety of phytophysognomies, and *A. castaneus*, restricted to the wet forests, both limited to the Neotropical region of South America. We estimated genetic diversity and structure, built haplotype networks, made bayesian phylogenetic inferences and demographic analyses. Results were summarized in two manuscripts that correspond to the two chapters in this thesis. In the first chapter, entitled “Insights on the Neotropical history provided by a multilocus phylogeographic study of the web spider *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae)”, we analyzed 26 populations distributed from eastern Amazon to southern Atlantic Forest and gathered three nuclear (ITS2, H3 and TIF5A) and one mitochondrial (COI) markers. *A. lagotis* diversification started on Pliocene, but genetic structure strongly increased on Pleistocene, suggesting that climate oscillations from this period may have contributed to this pattern. Results also suggest distinct colonization events of tropical and subtropical portions of Atlantic Forest. In chapter two, “Phylogeographical patterns of *Aglaoctenus castaneus* (Araneae, Lycosidae) between Amazon and Atlantic Forest”, we used six populations and two molecular markers (COI and ITS2). The high genetic structure between the two biomes suggests a vicariant role for the dry diagonal; however, the estimated divergence between clades correspondent to each rainforest was posterior to the emergence of this savanna region, indicating gene flow maintenance between populations within each forest until Quaternary. Lineages from each biome also presented genetic structure, suggesting that historical events in a regional scale also contributed to shape the current diversity pattern of this species. Our results agree with the general consensus that Neotropical biomes history is complex, mainly due to orogenic and climatic changes that influenced the landscape over time, and highlight the importance of using different organisms with a broader distribution to elucidate biogeographical questions in the Neotropics.

SUMÁRIO

Introdução Geral	11
Objetivos	15
Metodologia	15
Área de estudo e coletas	15
Marcadores moleculares	16
Capítulo 1: Insights on the Neotropical history provided by a multilocus phylogeographical study of the web spider <i>Aglaoctenus lagotis</i> (Araneae, Lycosidae)	18
Abstract.....	18
Introduction.....	18
Material and Methods.....	20
Results	24
Discussion	38
Acknowledgments	41
References.....	42
Capítulo 2: Padrão filogeográfico de <i>Aglaoctenus castaneus</i> (Araneae, Lycosidae) entre as Florestas Atlântica a Amazônica	53
Introdução	53
Material e Métodos.....	55
Resultados	58
Discussão	64
Conclusão.....	66
Referências.....	67
Discussão e Considerações finais	75
Referências	77

Introdução Geral

A América do Sul compreende a maior parte dos Neotrópicos, uma região caracterizada por grande biodiversidade (Myers *et al.*, 2000) e com uma gama de ambientes heterogêneos, como biomas florestais e paisagens desérticas (Ab'Saber, 1977). A origem dessa biodiversidade é atribuída a eventos orogênicos e climáticos ao longo de milhões de anos, que causaram profundas mudanças na paisagem do continente (Smith *et al.*, 2014).

A ascensão da Cordilheira dos Andes foi um dos eventos orogênicos de maior impacto na região; esse processo foi muito intenso durante o Mioceno médio e superior, desencadeando a ocorrência de outros grandes eventos como o fechamento do Istmo do Panamá, a formação da bacia do rio Amazonas e alterações na circulação de ventos e correntes marinhas (Hoorn *et al.*, 2010). Essas alterações em conjunto propiciaram o surgimento de uma região mais árida na porção central do continente (Potter & Szatmari, 2009; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011; Armijo *et al.*, 2015), coincidente com a época em que gramíneas com metabolismo fotossintético C4 passaram a ocorrer em grande parte das regiões tropicais do planeta (Keeley & Rundel, 2005). Assim, houve uma redução progressiva da área de distribuição dos domínios florestais, que anteriormente formavam um contínuo de leste a oeste da América do Sul (Morley, 2000), formando-se um corredor de vegetação aberta entre essas áreas de florestas úmidas, que hoje correspondem às Florestas Amazônica e Atlântica (Simon *et al.*, 2009; Werneck, 2011).

Esse corredor, conhecido como diagonal seca, é constituído pelos biomas da Caatinga, Cerrado e Chaco; considerado uma barreira ao fluxo gênico entre as duas grandes florestas, seu estabelecimento tem sido caracterizado como um evento vicariante que provocou a diversificação de linhagens entre as duas florestas (Cabanne *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; Fouquet *et al.*, 2012ab). No entanto, estudos paleopalinológicos e geológicos sugerem que períodos de maior umidade, principalmente no Pleistoceno, provocaram o aparecimento de florestas de galeria ao longo das regiões mais secas, promovendo conexões recorrentes entre as Florestas Amazônica e Atlântica (Oliveira *et al.*, 1999; Behling *et al.*, 2000; Auler & Smart, 2001; Auler *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Estudos de composição florística (Por, 1992; Melo-Santos *et al.*, 2007), de filogeografia (Costa, 2003; Batalha-Filho *et al.*, 2013) e de modelagem de nicho ecológico (Sobral-Sousa *et al.*, 2015) corroboram essa hipótese, indicando que as conexões permitiriam eventos de

dispersão que teriam sido importantes para o estabelecimento dos atuais padrões biogeográficos na região neotropical.

Os detalhes relacionados à formação desse cenário biogeográfico ainda não são claros, mas inferências sobre a história evolutiva de organismos que ocorrem nas florestas úmidas e na diagonal seca possibilitam reconstruir parte da história dessa região. A filogeografia tem sido extensivamente empregada para auxiliar no entendimento dos eventos históricos de diversificação de regiões, pois permite a investigação dos processos populacionais correspondentes aos padrões biogeográficos e de diversidade (Bermingham & Moritz, 1998; Avise, 2009; Beheregaray, 2008). Apesar do número crescente de pesquisas no continente sul-americano, ainda existe grande defasagem quando comparado aos estudos filogeográficos em outras regiões do mundo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013; Morrone, 2014; Prates *et al.*, 2016).

A filogeografia teve origem como disciplina na década de 1980 e possui grande associação com os conceitos de biogeografia histórica e genética de populações, sendo considerada uma ponte entre os estudos de processos macro e microevolutivos (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2009; Bermingham & Moritz, 1998). Inicialmente baseada na análise do DNA mitocondrial e com um caráter descritivo dos padrões filogeográficos, essa área de estudo passou por mudanças significativas nos últimos anos, como o incremento no número de marcadores moleculares utilizados (Garrick *et al.*, 2015). Aliado a isso, o desenvolvimento de abordagens inovadoras como a modelagem de nicho ecológico (ENM) e os testes baseados em simulações de modelos, como o *Approximate Bayesian Computation* (ABC), trouxeram maior rigor estatístico e robustez aos resultados (Knowles & Maddison, 2002; Richards *et al.*, 2007; Carstens & Richards, 2007; Hickerson *et al.*, 2010; Garrick *et al.*, 2015).

Estudos filogeográficos com espécies de ocorrência na Floresta Atlântica e Amazônica, ou ambas, são o foco da maior parte das pesquisas (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013), embora recentemente os biomas da diagonal seca também estejam recebendo atenção (Collevatti *et al.*, 2009; Ramos & Melo, 2010; Werneck, 2011; Prado *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2014). No entanto, análises integrativas incluindo biomas de vegetação aberta e florestais são raras, apesar da sua grande importância para a compreensão dos processos de diversificação (Costa, 2003; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013; Morrone, 2014). Além disso, ainda que seja importante uma boa representatividade dos mais diversos grupos de organismos em estudos de filogeografia, os vertebrados e plantas recebem maior atenção e os invertebrados terrestres, que possuem imensa diversidade, são pouco utilizados e normalmente figuram pesquisas acerca de insetos vetores de doenças humanas (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Assim,

existe uma lacuna no sentido de explorar os padrões filogeográficos de invertebrados em uma ampla escala geográfica na América do Sul.

As aranhas (Arachnida: Araneae) caracterizam-se como bons materiais para pesquisa pois, além de serem abundantes na região neotropical, algumas espécies possuem características interessantes como um alto nível de persistência, hábitos sedentários (principalmente para aranhas tecedoras) e requerimentos ecológicos específicos, que podem contribuir para a retenção de sinais biogeográficos (Moritz *et al.*, 2001; Beavis *et al.*, 2011). Essa ordem já foi alvo de estudos em diversos locais no mundo que mostraram resultados interessantes como padrões de diversificação consistentes com períodos de grande atividade geológica ou de oscilações climáticas na América do Norte (Ayoub & Riechert, 2004; Starrett & Hedin, 2007), hipóteses sobre refúgios florestais na Europa (Bidegaray-Batista *et al.*, 2013), influência de nichos ecológicos na história evolutiva de espécies simpátricas na Austrália (Beavis *et al.*, 2011) e identificação de diversidade críptica em espécies de caverna na China (Zhang & Li, 2014). No Brasil apenas dois estudos filogeográficos foram conduzidos com aranhas, um deles com uma espécie endêmica da Caatinga (Magalhaes *et al.*, 2014) e o outro com uma espécie de distribuição subtropical (Peres *et al.*, 2015); ambos revelaram padrões intrigantes e contrastantes com as hipóteses correntes acerca dos efeitos das oscilações climáticas na história demográfica dos organismos dessas regiões.

Esse grupo de artrópodes terrestres é amplamente distribuído no mundo, ocorrendo em praticamente todos os continentes, com exceção da Antártida (Platnick, 1995). A ordem é atualmente dividida em 114 famílias, e um pouco mais de 46 mil espécies já foram descritas (World Spider Catalog, 2016). Porém, estimativas sugerem que esse número seja muito maior (Coddington & Levi, 1991) e que grande parte ocorra nos Neotrópicos. No Brasil estima-se que menos da metade das espécies sejam conhecidas (Brescovit, 1999).

A família Lycosidae apresenta ampla distribuição geográfica no mundo (Platnick, 1995), sendo uma das mais diversas e abundantes entre os aracnídeos, com aproximadamente 2.300 espécies, a maioria delas com hábito errante e noturno (Foelix, 2011). Os gêneros *Aulonia*, *Hippasa*, *Sosippus* e *Aglaoctenus* são exceções, apresentando espécies que confeccionam teias rudimentares em formato de funil (Foelix, 2011) (Figs. 1a e 1c). O gênero *Aglaoctenus* ocorre apenas na América do Sul; duas espécies do gênero possuem uma distribuição abrangente (Fig. 1): *A. lagotis*, que ocupa diversos tipos de *habitats* desde o norte da Argentina, se estendendo pela região central do Brasil e Floresta Atlântica, e *A. castaneus*, que ocorre apenas nas florestas úmidas, Amazônica e Atlântica, e não ocorre na diagonal seca

(Santos & Brescovit, 2001). As demais espécies ocorrem apenas no sul do Brasil e na Argentina (Santos *et al.*, 2003; Piacentini, 2011).



Figura 1. Espécies do gênero *Aglaoctenus*. a) Teia de *A. castaneus*; b) Exemplo de *A. castaneus*; c) Teia de *A. lagotis*; d) Exemplo de *A. lagotis* carregando o ovissaco junto às fiandeiras.

Assim como os demais representantes da família Lycosidae, as espécies de *Aglaoctenus* apresentam cuidado maternal, um comportamento considerado subsocial e incomum para aracnídeos (Foelix, 2011; Stefani *et al.*, 2011). Os machos abandonam a sua teia à procura de uma fêmea assim que tem início a época reprodutiva, permanecendo na teia da fêmea escolhida até a cópula (Bucher, 1974). Após a deposição, as fêmeas carregam o ovissaco preso às fiandeiras, protegendo-o até a eclosão dos ovos; os jovens que emergem seguem para o dorso da mãe, onde permanecem por aproximadamente uma semana, e aos poucos se dispersam (Foelix, 2011), construindo suas teias próximas à materna (Santos & Brescovit, 2001).

A maior parte dos estudos realizados para o gênero *Aglaoctenus* abordaram aspectos taxonômicos (Santos & Brescovit, 2001; Santos *et al.*, 20003; Piacentini, 2011). *Aglaoctenus lagotis* foi alvo de pesquisas sobre comportamento de cópula e cuidado maternal (Stefani *et al.*, 2011), diferenças no comportamento sexual (González *et al.*, 2013), diferenças fenológicas (González *et al.*, 2014), isolamento reprodutivo (González *et al.*, 2015a),

construção de teia (González *et al.*, 2015b) e efeitos da fragmentação florestal dos pontos de vista ecológico (Stefani & Del-Claro, 2014) e genético (Macrini *et al.*, 2016). Todavia, nenhum estudo filogeográfico abrangendo populações ao longo da distribuição de *A. lagotis* ou *A. castaneus* foi realizado.

A grande aplicabilidade de aranhas para análises filogeográficas, seu pouco uso como modelo de estudo nos Neotrópicos e a necessidade de ampliar o conhecimento sobre os padrões e processos de diversificação nessa região foram considerações importantes para o planejamento deste trabalho.

Objetivos

O objetivo desta tese foi testar hipóteses sobre a diversificação da região neotropical da América do Sul, contribuindo para a compreensão do cenário biogeográfico formado pelas duas florestas úmidas e a diagonal seca, a partir dos padrões filogeográficos de duas espécies sul-americanas do gênero *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae).

Com o intuito de obter diferentes perspectivas acerca desse cenário biogeográfico, utilizamos como modelos a espécie *A. lagotis*, que possui distribuição desde a Argentina até a região norte do continente, ocorrendo em formações florestais úmidas e nos biomas da diagonal seca, e a espécie *A. castaneus*, de distribuição restrita às florestas úmidas.

Entre os objetivos específicos destacam-se:

- a) Quantificar a variabilidade e estruturação genética das populações amostradas;
- b) Comparar os resultados obtidos pelos marcadores mitocondriais e nucleares;
- c) Verificar se as populações de *A. lagotis* e *A. castaneus* apresentam linhagens intraespecíficas geograficamente estruturadas;
- d) Estimar o tempo de coalescência entre as populações, correlacionando o tempo de divergência e possíveis eventos geológicos e/ou climáticos a que estas foram submetidas.

Metodologia

Área de estudo e coletas

Nossa área de estudo abrangeu grande parte da região neotropical do continente sul-americano; o desenho amostral foi baseado na revisão de Santos & Brescovit (2001) para o gênero *Aglaoctenus* (Fig. 2a).

Realizamos um grande esforço amostral ao longo da distribuição dessas espécies, que pode ser visualizado no mapa da figura 2b. Em muitos locais visitados não encontramos exemplares das aranhas. Esse padrão foi mais frequente para *A. castaneus*, e conseguimos amostrar essa espécie apenas nos limites de sua distribuição descrita (Fig. 2c). Para *A. lagotis* encontramos exemplares em locais em que esperávamos ser de ocorrência da outra espécie (Fig. 2c). Esses fatos sugerem modificações na distribuição recente das duas espécies, que merecem futuras investigações.

Para *A. lagotis* amostramos 26 localidades distribuídas nos biomas das Florestas Atlântica e Amazônica, no Cerrado, Chaco e Pantanal. Para *A. castaneus* amostramos seis localidades nas Florestas Amazônica e Atlântica, sendo que a Amazônia foi amostrada apenas na porção da região andina (Colômbia e Equador).

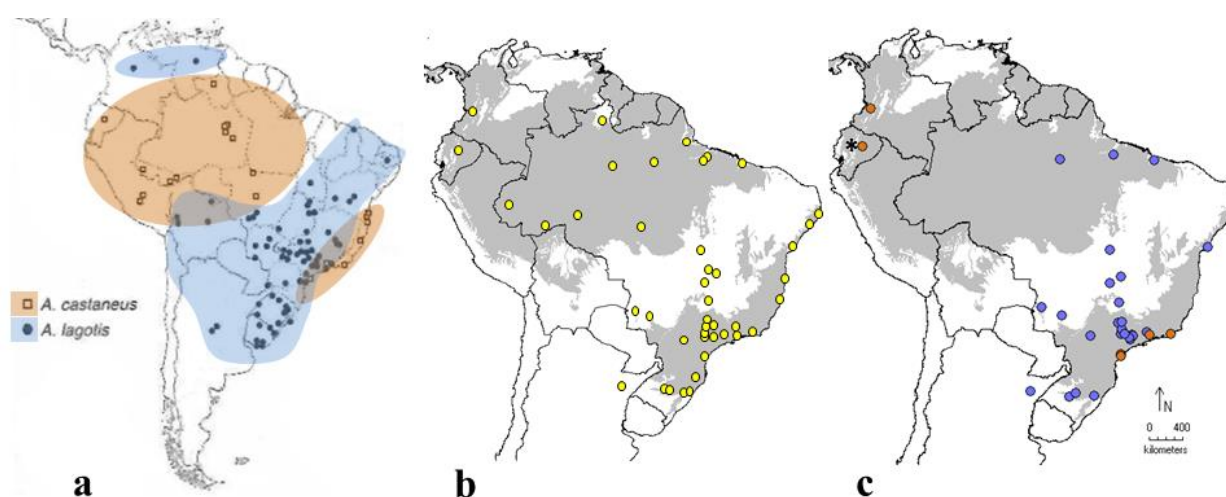


Figura 2. Mapa da América do Sul. a) Registros de ocorrência de *A. lagotis* e *A. castaneus* (modificado de Santos & Brescovit, 2001); b) Localidades visitadas em expedições de coleta; c) Localidades amostradas em azul para *A. lagotis* e em marrom para *A. castaneus* (asterisco indica amostra cedida da Coleção Taxonômica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG).

Marcadores moleculares

As análises filogeográficas foram realizadas com dois marcadores moleculares para *A. castaneus* e com quatro para *A. lagotis*. O marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e o marcador ribossomal Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) foram utilizados nas análises das duas espécies. Ambos já foram empregados com êxito em estudos com aranhas, mostrando boa resolução na detecção de variabilidade intraespecífica (Cooper *et*

al., 2011; Kuntner & Agnarsson, 2011; Magalhaes *et al.*, 2014; Peres *et al.*, 2015; Macrini *et al.*, 2016).

Para *A. lagotis* adicionamos dois marcadores nucleares às análises, um deles o gene Histona H3 (subunidade a) que foi recentemente utilizado para uma espécie de aranha endêmica da Caatinga (Magalhaes *et al.*, 2014) e, mesmo apresentando menor variabilidade, teve resultado satisfatório e congruente com o outro marcador mitocondrial empregado. Além disso, uma região intrônica denominada TIF5A também foi analisada; essa região foi prospectada no nosso laboratório a partir do sequenciamento do genoma de quatro espécies de aranhas (entre elas *A. lagotis*). Nesse processo foram detectadas potenciais regiões que apresentavam pares de éxons conservados flanqueando íntrons para serem utilizadas como marcadores moleculares em aranhas. Após a seleção e o desenho dos *primers*, com o auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007), realizamos testes de amplificação e selecionamos as que apresentaram boa qualidade de amplificação e polimorfismo.

As sequências dos *primers* utilizados e as informações pertinentes à amplificação e análise dos dados estão descritas nos capítulos que compõem esta tese.

Capítulo 1:

Insights on the Neotropical history provided by a multilocus phylogeographical study of the web spider *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae)

Abstract

Several evidences indicate that global historical events of cooling and dryness contributed to the emergence of an extensive area of open vegetation, known as dry diagonal (DD), between Amazon and Atlantic Forests. The formation of the DD is supposed to be a vicariant event that may have caused diversification in organisms distributed in the two Neotropical rainforests; in the other hand, several studies suggest that recurrent connections between these rainforests may have influenced present-day patterns of biodiversity in this region. Phylogeographic studies have helped clarify the historical dynamic of Neotropical biomes; thus, to address questions about the influence of evolutionary processes related to the emergence of the DD causing genetic structure, and to test hypotheses about connection routes between the two rainforests, we have used the widely distributed neotropical spider *Aglaoctenus lagotis*. We analysed 26 populations from Amazon to southern Atlantic Forest and coupled three nuclear and one mitochondrial marker in a phylogeographical approach. Our data point that diversification within this species occurred mainly on Pleistocene with the presence of five genetic groups geographically separated. The DD does not seem to act as a barrier for dispersal among the wet forests as we could determine putative connection routes between them. We also inferred a phylogeographical break between tropical and subtropical portions of the Atlantic Forest that may indicate complex historical processes of colonization in this region. Our work is a pioneer in using invertebrates distributed in several biomes and with a wide latitudinal gradient in the Neotropics, reinforcing important biogeographical patterns and developing new hypotheses.

Introduction

The Neotropical region is among the places with high biodiversity in the world (Myers *et al.*, 2000) harboring several different phytophysiognomies, from wet forests to desert landscapes (Ab'Saber, 1977). Among the Neotropical biomes stand two important

rainforests, Amazon and Atlantic Forest, separated by an area known as South American dry diagonal (DD) that comprises Caatinga, Cerrado and Chaco biomes. There are evidences that these two rainforests had been connected during the Eocene and were separated by the formation of the DD during the Neogene (Bigarella *et al.*, 1975; Morley, 2000; Zanella, 2011). At this time, major tectonic events, such as the uplift of the Andean Cordillera and the closure of the Panama Isthmus, caused changes in drainage basin systems, wind circulation and oceanic currents that led to an increased aridity in central South America (Hoorn *et al.*, 2010; Rull, 2011).

The emergence of the DD is considered a potential vicariant event that may have caused diversification between organisms from Amazon and Atlantic Forest (Cabanne *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; Fouquet *et al.*, 2012 a,b). In addition, the evidences of later recurrent connections between these two forests point to a more complex scenario for the establishment of the present biogeographic patterns in the Neotropical region (Por, 1992; Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Costa, 2003; Melo-Santos *et al.*, 2007; Batalha-filho *et al.*, 2013; Fouquet *et al.*, 2014). In the southern hemisphere, Pleistocene climate oscillations caused alternation of cold and dry periods with wet and warm ones, with consequences to the different plant formations (Morley, 2000; Quattrocchio *et al.*, 2011). Some authors argue that wet forests were restricted to isolated patches during glacial periods and expanded during interglacials (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1981; Hooghiemstra & van der Hammen, 1998); however, there are suggestions that wet forests' geographic distribution changed according to the climate. In this scenario, during the cold and dry periods there were large wet areas across the current range of the DD where the putative ranges of Amazon and Atlantic Forest could overlap enabling lineages exchanges (Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Sobral-Souza *et al.*, 2015).

Studies with organisms broadly distributed in the Neotropics, associated with adequate molecular markers may help to elucidate biogeographic questions that have been successfully addressed through phylogeography (Avise, 2000; Riddle & Hafner, 2006; Beheregaray, 2008; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Phylogeography main's achievement has been to enable inferences about the influence of past events, such as climate and orogenic changes, and ecological interactions in present-day biodiversity distribution (Avise, 1998, 2000; Bermingham & Moritz, 1998). In the last few years a higher number of molecular markers and the development of more complex statistical approaches provided testable approaches and more reliable phylogeographical inferences (Avise, 2009; Hickerson *et al.*, 2010; Garrick *et al.*, 2015).

Most phylogeographical surveys have focused on plants and vertebrates (Beheregaray, 2008; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013) while other groups, such as spiders, have received less attention (Beavis *et al.*, 2011) despite being distributed worldwide. The few studies that have used spiders presented diversification patterns related to the Neogene (Starrett & Hedin, 2007) and Pleistocene, supporting hypotheses on the presence of glacial refugia in North America (Ayoub & Riechert, 2004) and Europe (Bidegaray-Batista *et al.*, 2013). In South America, two recent studies with arachnids (Magalhaes *et al.*, 2014; Peres *et al.*, 2015) have shown that this group is a good model also in the neotropical region.

Aglaoctenus lagotis (Holmberg, 1876) is a widely distributed lycosid in South America, occurring in forest areas, savannas and even in rural and urbanized areas (Santos & Brescovit, 2001; Stefani *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013). As the spiderlings build their webs usually close to the mother's (Santos & Brescovit, 2001; Foelix 2011) and ballooning (aerial dispersal using silk threads) seems not important in lycosids (Stefani & Del-Claro, 2014), it is reasonable to assume they are poor-dispersers and that they retain strong biogeographical signs, making these spiders adequate for phylogeographical studies .

In this work we used the spider *A. lagotis* to investigate historical evolutionary processes related to diversification in the Neotropics. We sampled populations from Amazon to southern Atlantic Forest and coupled three nuclear and one mitochondrial marker in a phylogeographical approach to address the following questions: i) when did the major diversification processes in this species occur; ii) what is the role of the DD on the diversification of this widely distributed invertebrate; iii) test hypotheses about connection routes between the two rainforests.

Material and Methods

Taxon sampling, DNA isolation, amplification and sequencing

We collected 208 individuals in 26 locations along the geographical distribution of *A. lagotis* (Fig 2). *Aglaoctenus castaneus* and *Aglaoctenus oblongus* were also collected and used as outgroup in phylogenetic analyses. The genomic DNA extraction was performed using 2-4 legs and followed the protocol suggested by the manufacturer of Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). The abdomens were kept in alcohol 95% and sent to the Coleção Científica de Aracnídeos e Miriápodos of Butantan Institute for identification.

We sequenced one mitochondrial and three nuclear gene fragments. For the mtDNA and one nuDNA marker (ITS2) we obtained sequences for all samples, while for the

two other nuclear genes we sequenced a representative subsample (104 individuals). The Cytochrome Oxidase I (COI) was chosen as the mitochondrial region and the primers used for amplification were C1-N-2776 (Hedin & Maddison, 2001) e C1-J-1751 (Simon *et al.*, 1994) under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. For the nuclear genes we chose: the Internal Transcribed Subunit II (ITS2), that was amplified using primers 5.8S and 28S (White *et al.*, 1990); the Histone 3 (subunit a), using primers H3F and H3R (Colgan *et al.*, 1998); and TIF5A, an intronic region that was prospected in the genome of *A. lagotis*, using novel primers: TIF5AF (AAGACAGGAAAGCATGGACA) and TIF5AR (TCAAGTCCTACAAGATGAAC) described in this study. All nuclear regions were amplified under similar conditions, changing only the annealing temperature (ITS2 at 58°C, H3 and TIF5A at 50°C): 95°C for 4 min; 35 cycles at 95°C for 45 sec, annealing temperature for 45 sec and 72°C for 2 min; and extension at 72°C for 10 min. Sequencing was performed in Prism 377 (Perkin Elmer) capillary sequencer. Sequences were aligned using MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) and edited in MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011).

We conducted a haplotype reconstruction for the nuclear sequences with heterozygous sites in DNAsp 5.1 (Librado & Rozas, 2009) using algorithms provided by PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003), with a minimum posterior probability of 0.9.

Bayesian analysis of genetic population structure

We run a Bayesian analysis using the Spatial Clustering of Individuals option in BAPS 6.0 (Corander *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2013). We let BAPS determine the most probable number of distinct gene pools (k) in the data, evaluating it over a $1 \leq k \leq 20$ range and using five replicates to ensure the reliability of results. We performed this analysis categorizing the dataset in two types: (1) mitochondrial and (2) nuclear.

Estimates of genetic diversity, population structure and haplotype networks

The estimates of genetic diversity were calculated separately by marker in each population and each genetic group in ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Pairwise Φ_{ST} values were calculated separately by marker for each genetic group and in addition we performed an analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) in

ARLEQUIN to test for hierarchical organization of the genetic structure among the genetic groups. The statistical correlations between geographic and genetic distances (D_A) (Nei & Li, 1979) were performed with a Mantel test in GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). The haplotype networks were obtained for each marker using the median-joining algorithm (Bandelt *et al.*, 1999) implemented in the software PopART (Leigh & Bryant, 2015).

Phylogenetic analysis and divergence time estimation

The Bayesian phylogenetic tree and divergence time estimates were inferred in BEAST1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). The substitution models were selected in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) based on Akaike Information Criterion (AIC). Due to the lack of fossil records for this group, we used mutation rates obtained for the spider genus *Parachtes* (Bidegaray-Batista & Arnedo, 2011) to calibrate the nodes in the trees and estimate divergence times (mean rate = 0.0125 for COI). The analyses were performed using a lognormal relaxed clock, as the ML test for Molecular Clocks implemented in MEGA6 reject the molecular clock hypothesis ($p = 0$). We performed the analyses with mitochondrial and nuclear sequences separately. For the COI we run ten million generations of MCMC chains, sampling trees every 1000 generations; for the nuclear we run one hundred million generations of MCMC chains, sampling trees every 10000 generations. Convergence of the stationary distribution was checked in Tracer 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) by visual inspection and by the value of the posterior estimates of the parameters (minimum ESS accepted was 200). TreeAnnotator (available at BEAST package) was used to obtain the maximum credibility tree with a burn-in of 10% and the resulting tree was visualized in Figtree 1.4 (Rambaut, 2009).

Demographic signals

The historical demographic changes of a population can be assessed by genetic signals in their current representatives (Ho & Shapiro, 2011), so we performed some analyses to search for these signals in *A. lagotis*. Neutrality tests such as Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's F_s (Fu, 1997) and mismatch distribution analyses (Rogers & Harpending, 1992; Harpending 1994) were performed for all genes considering each genetic group and the whole dataset in ARLEQUIN. We conducted a multilocus Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) analysis for each genetic group to investigate fluctuations in effective population size over time (Heled & Drummond, 2008) in BEAST 1.8.0. We unlinked substitution, clock and tree

models of the four loci and applied the same nucleotide substitution models and mutation rates used in the phylogenetic analysis. We ran 200 million generations of MCMC chains and took samples every 20000 generations. Convergence of the stationary distribution was also checked in Tracer 1.5. The results obtained were plotted in graphics.

Demographic model testing for connections between Amazon and Atlantic Forests

We conducted a multilocus Approximate Bayesian Computation (ABC) to compare different hypotheses about putative connections between Amazon and Atlantic Forest through the DD. Based on our results we performed two independent analyses: one only with Group A; and another with Groups B, D and E that presented high similarity (see Results).

As Group A is widespread we separated the individuals according to the biome where they occur. We built models for three different scenarios. Scenario 1: Panmixia (a single population that exchanges genes through the entire area); Scenario 2: Fragmentation of a past widespread population; and Scenario 3: Colonization. The colonization scenario had three alternatives: a) from AM to AF through the DD; b) from AF to AM through DD; c) from DD to both AM and AF.

We also built models for five different scenarios considering Groups B, D and E as they have a disjoint distribution on the three biomes (AM, AF and DD). Scenario 1: Panmixia; Scenario 2: Fragmentation of a past widespread population; Scenario 3: Colonization from AM; Scenario 4: Colonization from AF and Scenario 5: Colonization from DD. All Colonization Scenarios had three possible ways regarding each biome.

For both analyses we implemented a hierarchical approach (Fagundes, 2007; Peres *et al.*, 2015) where we first inferred the best models within Colonization Scenarios and then gathered these models with the other scenarios to ultimately select the one that best fits our empirical data. To conduct the model test, we implemented the methodology described in Peres *et al.* (2015), performing simulations on ms (Hudson, 2002), using priors with broad uniform distributions and rejection steps with custom python scripts.

Results

Bayesian analysis of genetic population structure

The BAPS analysis performed with the mitochondrial marker indicated a larger number of clusters compared to the nuclear markers ($k = 7$ and $k = 3$, respectively) but, in spite of these different values, the results were not incongruent (Fig. 1). Considering also the phylogenetic trees and haplotype networks we decided to use a genetic subdivision in five clusters (identified as Group A, B, C, D and E) for subsequent analyses (Fig. 1).

Group A has individuals from the tropical portion of Brazil: Atlantic Forest, DD and Amazon; Group B has individuals from the Southern portion of the Atlantic Forest; Group C has individuals from South-central Brazil; Group D from the Southwestern portion of the DD (Chaco and Cerrado); and Group E only Amazonian individuals (Fig. 1).



Figure 1. Diagram of BAPS results. The first line exhibits the populations (see correspondent numbers in Table 1). Second and third lines exhibit mitochondrial and nuclear results. The last line exhibit the five clusters adopted.

Estimates of genetic diversity, population structure and haplotype networks

The four molecular markers generated a fragment of 1277 bp: 521 bp, 233 bp, 241 bp and 282 bp for COI, H3, ITS2 and TIF5A, respectively. The haplotype reconstruction for the nuclear markers resulted in 398 resolved sequences for ITS2; 178 for H3 and 198 for TIF5A. The estimates of diversity for each population and each genetic group are presented in Table 1 and 2, respectively. For all sequences, the number of haplotypes ranged from 13 (H3) to 53 (COI), nucleotide diversity ranged from 0.009 to 0.045 and all markers showed high values of haplotype diversity (Table 2). A great number of populations showed only one haplotype for ITS2 and TIF5A markers (Table 1) and the same pattern was found in Group E (Table 2).

Tabela 1. Diversity indexes for populations of *Aglaoctenus lagotis*. (N = n° of sequences; H = n° of haplotypes; Hd = haplotype diversity; π = nucleotide diversity; (s.d.) = standard deviation).

Markers COI					H3				ITS2				TIF5A			
Populations	N	H	H _d (s.d.)	π (s.d.)	N	H	H _d (s.d.)	π (s.d.)	N	H	H _d (s.d.)	π (s.d.)	N	H	H _d (s.d.)	π (s.d.)
1 Brasília (DF)	8	4	0.75 (0.13)	0.007 (0.004)	8	4	0.78 (0.11)	0.004 (0.003)	16	1	0	0	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)
2 Porangatu (GO)	8	4	0.78 (0.11)	0.001 (0.001)	6	2	0.60 (0.12)	0.002 (0.002)	16	3	0.24 (0.13)	0.001 (0.001)	6	3	0.46 (0.20)	0.002 (0.002)
3 Uberlândia (MG)	7	2	0.28 (0.19)	0.007 (0.004)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	1	0	0
4 Santarém (PA)	9	1	0	0	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	18	1	0	0	8	1	0	0
5 Goiânia (GO)	8	4	0.64 (0.18)	0.019 (0.011)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	3	0.42 (0.13)	0.001 (0.001)	6	2	0.25 (0.18)	0.001 (0.001)
6 Passa-Quatro (MG)	8	2	0.57 (0.09)	0.014 (0.008)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	2	0.23 (0.12)	0.0009 (0.001)	8	2	0.42 (0.16)	0.001 (0.001)
7 Mata de São João (BA)	8	2	0.42 (0.16)	0.009 (0.005)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	3	0.66 (0.07)	0.003 (0.002)	8	1	0	0
8 Argentina	7	4	0.71 (0.18)	0.009 (0.006)	8	2	0.25 (0.18)	0.001 (0.001)	10	6	0.76 (0.07)	0.008 (0.005)	8	4	0.75 (0.13)	0.008 (0.005)
9 Campo Grande (MS)	8	1	0	0	8	1	0	0	12	6	0.85 (0.06)	0.014 (0.008)	6	3	0.60 (0.16)	0.003 (0.002)
10 Moju (PA)	8	3	0.46 (0.20)	0.001 (0.001)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	1	0	0
11 São Luís (MA)	8	3	0.60 (0.16)	0.002 (0.001)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	1	0	0
12 Campo Bom (RS)	8	3	0.67 (0.12)	0.008 (0.005)	-	-	-	-	16	1	0	0	8	1	0	0
13 Santa Maria (RS)	8	2	0.42 (0.16)	0.004 (0.003)	4	2	0.66 (0.20)	0.002 (0.003)	16	2	0.12 (0.10)	0.002 (0.002)	6	2	0.25 (0.18)	0.001 (0.001)
14 Arroio do Tigre (RS)	8	4	0.82 (0.10)	0.007 (0.004)	6	4	0.86 (0.12)	0.004 (0.004)	12	4	0.61 (0.13)	0.008 (0.005)	8	1	0	0
15 Jundiá (SP)	9	3	0.55 (0.16)	0.005 (0.003)	4	4	1.00 (0.17)	0.005 (0.005)	16	6	0.85 (0.05)	0.011 (0.006)	8	3	0.71 (0.12)	0.008 (0.005)
16 Pinhalzinho (SP)	7	2	0.57 (0.11)	0.003 (0.002)	2	2	1.00 (0.50)	0.004 (0.006)	14	3	0.47 (0.13)	0.008 (0.005)	8	3	0.60 (0.16)	0.007 (0.005)
17 Monte Alegre (SP)	9	2	0.38 (0.16)	0.012 (0.007)	8	4	0.92 (0.08)	0.006 (0.005)	18	5	0.75 (0.06)	0.014 (0.008)	8	2	0.57 (0.09)	0.014 (0.009)
18 Sousas RC (SP)	8	3	0.67 (0.12)	0.020 (0.011)	8	4	0.92 (0.08)	0.006 (0.004)	14	4	0.64 (0.08)	0.013 (0.008)	8	3	0.67 (0.12)	0.024 (0.014)
19 Centenário Sul (PR)	8	4	0.64 (0.18)	0.001 (0.001)	6	1	0.60 (0.12)	0.002 (0.003)	16	3	0.24 (0.13)	0.001 (0.001)	6	4	0.78 (0.15)	0.025 (0.015)
20 Sousas (SP)	8	2	0.25 (0.18)	0.0009 (0.001)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	2	0.23 (0.12)	0.0009 (0.001)	8	3	0.75 (0.09)	0.029 (0.017)
21 Barão Geraldo (SP)	8	2	0.42 (0.16)	0.001 (0.001)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	1	0	0
22 Jaboticabal (SP)	8	6	0.92 (0.08)	0.011 (0.006)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	3	0.46 (0.20)	0.023 (0.013)
23 Valinhos (SP)	8	2	0.25 (0.18)	0.0004 (0.0006)	6	2	0.60 (0.12)	0.002 (0.002)	12	1	0	0	8	5	0.85 (0.10)	0.027 (0.016)
24 Iracemápolis (SP)	8	4	0.82 (0.10)	0.010 (0.006)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	2	0.12 (0.10)	0.0005 (0.0009)	8	2	0.57 (0.09)	0.014 (0.009)
25 Ribeirão Preto (SP)	8	3	0.46 (0.20)	0.0009 (0.001)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	1	0	0	8	3	0.71 (0.12)	0.033 (0.019)
26 Corumbá (MS)	8	2	0.42 (0.16)	0.0008 (0.0009)	8	2	0.57 (0.09)	0.002 (0.002)	16	3	0.49 (0.11)	0.002 (0.002)	8	2	0.42 (0.16)	0.001 (0.001)

Table 2. Diversity indexes and neutrality tests for the genetic groups. (N = n° of sequences; S = n° of polymorphic sites; H = n° of haplotypes; H_d = haplotype diversity; π = nucleotide diversity; (s.d.) = standard deviation; FS = Fu's FS; D = Tajima's D; (p) p-value. In bold, the statistical significant values ($p < 0.05$). (*) analysis cannot be performed with one haplotype).

Molecular Marker	Genetic Group	N	S	H	H_d (s.d.)	π (s.d.)	FS	D	Mismatch Distribution
COI	A	56	40	17	0.93 (0.01)	0.017 (0.009)	0.89	0.12	Non-unimodal
	B	51	18	11	0.85 (0.03)	0.008 (0.005)	0.84	0.47	Non-unimodal
	C	70	20	15	0.82 (0.02)	0.005 (0.003)	-306	-0.87	Non-unimodal
	D	15	18	5	0.67 (0.10)	0.011 (0.006)	3.81	0.48	Non-unimodal
	E	16	5	5	0.53 (0.14)	0.001 (0.001)	-155	-1.21	Non-unimodal
	Total	208	82	53	0.96 (0.004)	0.029 (0.029)	-3.77	0.36	Non-unimodal
H3	A	54	2	4	0.75 (0.01)	0.004 (0.003)	0.94	2.24	Non-unimodal
	B	24	2	4	0.77 (0.03)	0.004 (0.003)	0.25	2.02	Non-unimodal
	C	68	3	4	0.53 (0.02)	0.002 (0.002)	-0.10	-0.00	Non-unimodal
	D	16	1	2	0.12 (0.10)	0.0005 (0.001)	-0.70	-1.16	Non-unimodal
	E	16	1	2	0.53 (0.04)	0.002 (0.002)	1.36	1.52	Non-unimodal
	Total	178	7	13	0.88 (0.009)	0.009 (0.006)	-1.32	1.80	Unimodal
ITS2	A	114	6	8	0.26 (0.05)	0.001 (0.001)	-8.19	-1.66	Unimodal
	B	94	7	11	0.71 (0.03)	0.013 (0.007)	0.43	3.10	Non-unimodal
	C	136	5	6	0.14 (0.04)	0.0006 (0.001)	-7.08	-1.70	Unimodal
	D	22	7	9	0.90 (0.03)	0.010 (0.006)	-1.96	1.15	Non-unimodal
	E	32	0	1	0	0	*	*	*
	Total	398	19	35	0.81 (0.01)	0.016 (0.0003)	-10.0	0.78	Non-unimodal
TIF5A	A	52	2	4	0.45 (0.07)	0.002 (0.001)	-0.94	0.10	Non-unimodal
	B	46	7	6	0.44 (0.08)	0.006 (0.004)	0.61	-0.47	Non-unimodal
	C	70	21	8	0.64 (0.05)	0.026 (0.013)	8.18	2.09	Non-unimodal
	D	14	7	5	0.67 (0.12)	0.006 (0.004)	-0.28	-0.79	Non-unimodal
	E	16	0	1	0	0	*	*	*
	Total	198	51	24	0.88 (0.01)	0.045 (0.023)	5.91	0.97	Non-unimodal

The haplotype networks (Fig. 2) showed that haplotypes are exclusive of the genetic groups (except for H3); in addition, we found several exclusive ones within populations: 42, 26 and 14 for COI, ITS2 and TIF5A, respectively. The COI and TIF5A haplotype networks showed a great structuring among the five groups, with a considerable number of mutational steps separating them (Fig. 2). The ITS2 network showed that each group has one most frequent haplotype, and some less frequent ones, all closely related to each other (Fig. 2). The H3 network presented few haplotypes, two of them shared with groups C, D and E (Fig. 2). Groups D and E presented haplotypes very related to each other in all networks (Fig. 2).

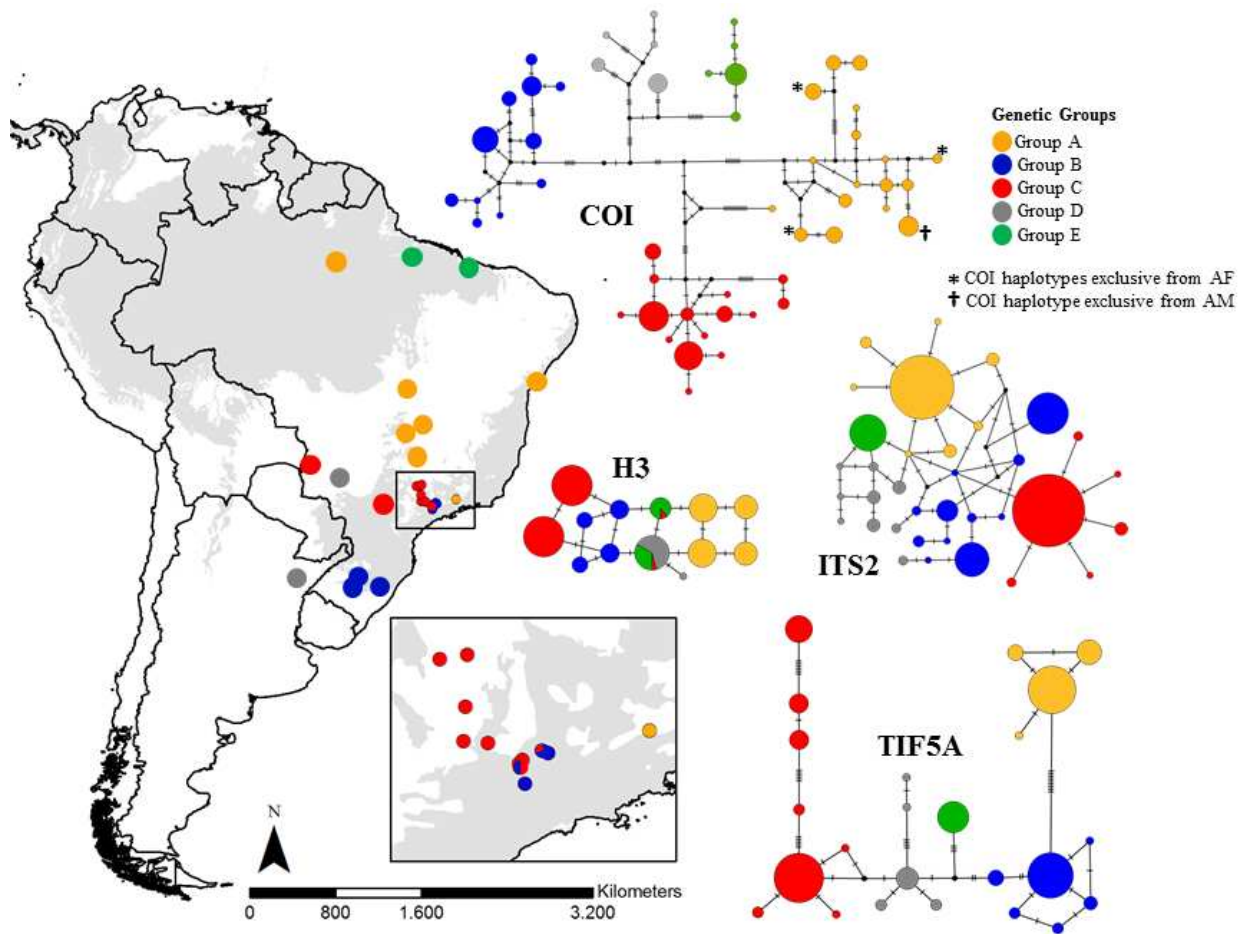


Figure 2. Sampling sites and median-joining haplotype networks of the molecular markers. Colors represent genetic groups.

The values of pairwise Φ_{ST} among genetic groups (Table 3) were very high, ranging from 0.32 to 0.97. The overall Φ_{ST} values were 0.67, 0.68, 0.69 and 0.75 for COI, H3, ITS2 and TIF5A, respectively.

Table 3. Pairwise Φ_{ST} among genetic groups (below diagonal - COI or ITS2; upper diagonal - H3 or TIF5A). All values are significant.

COI\H3	A	B	C	D	E
Group A	0	0.69	0.79	0.63	0.55
Group B	0.60	0	0.60	0.67	0.57
Group C	0.71	0.79	0	0.79	0.75
Group D	0.61	0.70	0.81	0	0.41
Group E	0.69	0.81	0.87	0.72	0
ITS2\TIF5A	A	B	C	D	E
Group A	0	0.93	0.80	0.95	0.97
Group B	0.59	0	0.69	0.82	0.88
Group C	0.96	0.76	0	0.32	0.53
Group D	0.80	0.39	0.90	0	0.83
Group E	0.90	0.54	0.97	0.56	0

The Mantel tests were significant for COI and for nuclear markers. In spite of this, an interpretation of isolation by distance is compromised by the great dispersion of COI points along the first half of the geographic axis and by the low correlation value for the nuclear markers (Fig. 3) (Drummond & Vowler, 2012).

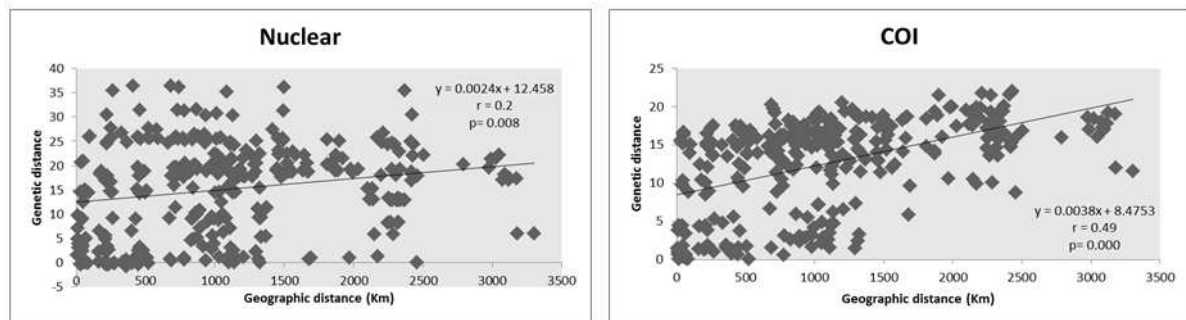


Figure 3. Correlations between genetic and geographic distances between pairs of populations of *Aglaotenus lagotis* for nuclear and COI sequences.

The AMOVA indicated that most part of the genetic variation can be attributed to differences among genetic groups for both mitochondrial and nuclear data (Table 4).

Table 4. AMOVA based on mitochondrial and nuclear datasets (d.f. = degrees of freedom, $p = 0$).

Source of variation	d.f.	Variation (%)
mtDNA		
Among genetic groups	4	70.68
Among populations within groups	23	15.58
Within populations	180	13.74
nuDNA		
Among genetic groups	4	77.20
Among populations within groups	22	9.02
Within populations	135	13.78

Phylogenetic analysis and divergence time estimation

The best substitution model was identified as HKY+G for COI, TIF5A and ITS2 and HKY for H3. The divergence of the three species of *Aglaoctenus* occurred during the Neogene, ca. 5 and 9 Ma (95% HPD = 3.2 – 15 Ma); *A. oblongus* was the first one to split, followed by *A. castaneus* and *A. lagotis* (Fig. 4). The nuclear and mitochondrial phylogenetic trees evidence the five groups for *A. lagotis*, with some differences in topology (Fig. 4). The Group A was recovered as basal in both trees, splitting around Plio-Pleistocene, while all the lineages (groups) diversification occurred mainly during Pleistocene. The COI tree presents one individual belonging to Group A that was not clustered in this clade; however, the posterior probability of the node is very low and the nuclear tree does not corroborate this pattern.

The order of divergence of groups B, C, D and E are not the same in the trees; nonetheless, inferences using the order these events require caution due to the overlap of the confidence intervals of time for the nodes.

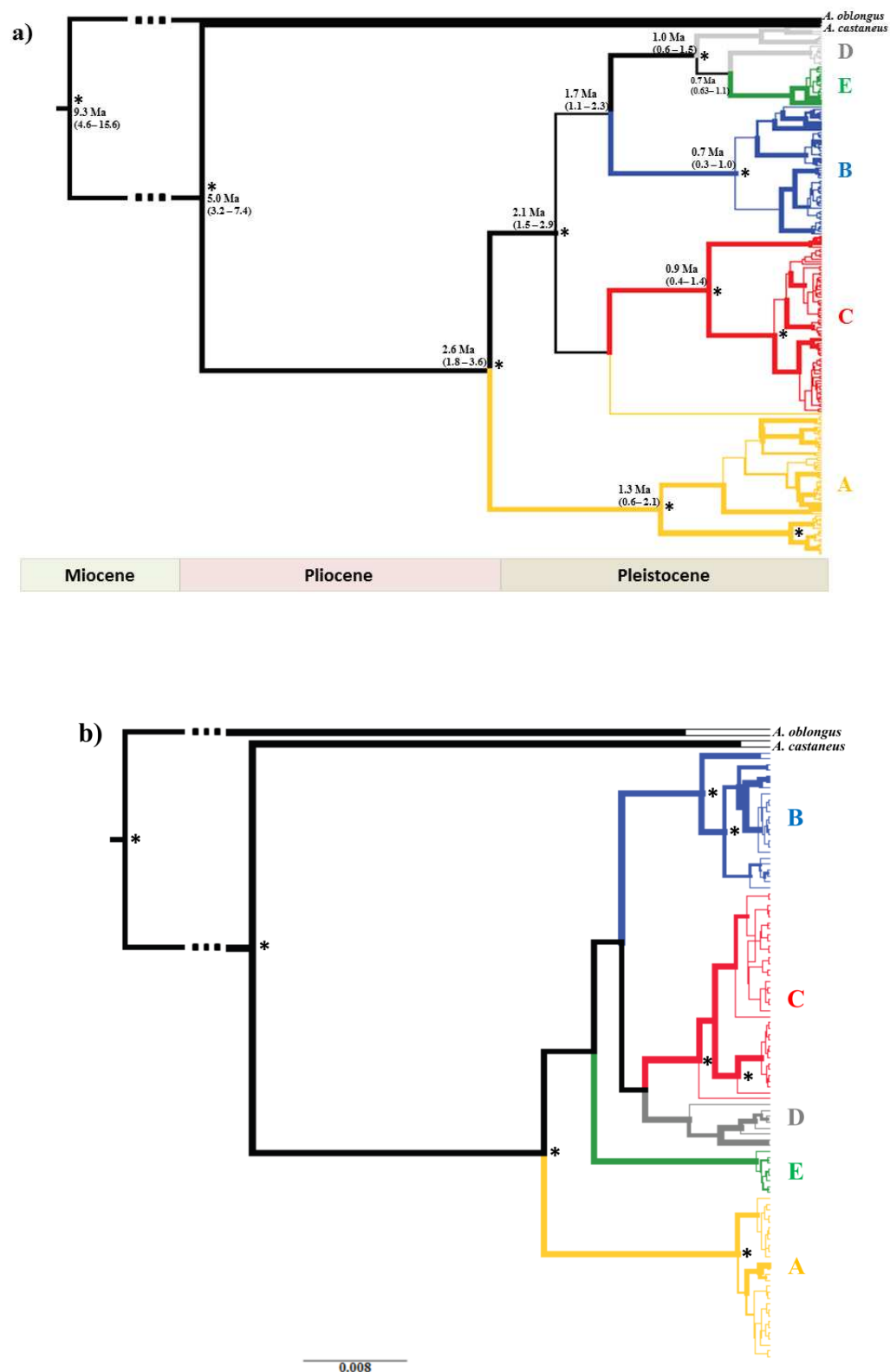


Figure 4. Bayesian phylogenetic inference for *Aglaoctenus lagotis*. a) COI tree with the divergence times of the main nodes shown with 95% HPD in parentheses; b) nuclear gene tree. Colors represent different genetic groups (A - E). Asterisks: nodes with posterior probabilities higher than 90%.

Demographic signals

Neutrality tests and mismatch distributions analysis did not show clear signals of population expansion. The neutrality tests performed for all sequences for each molecular marker detected recent expansion only for ITS2 (Fu's F_s) (Table 2). When the tests were performed for each genetic group, we detected recent expansion in ITS2 for Group A and C in both tests. The mismatch distribution results (Table 2) presented a unimodal curve for the overall dataset for H3 and for Group C and A for ITS2, indicating expansion. The EBS for each genetic group did not detect any historical demographic fluctuations (Fig. 5).

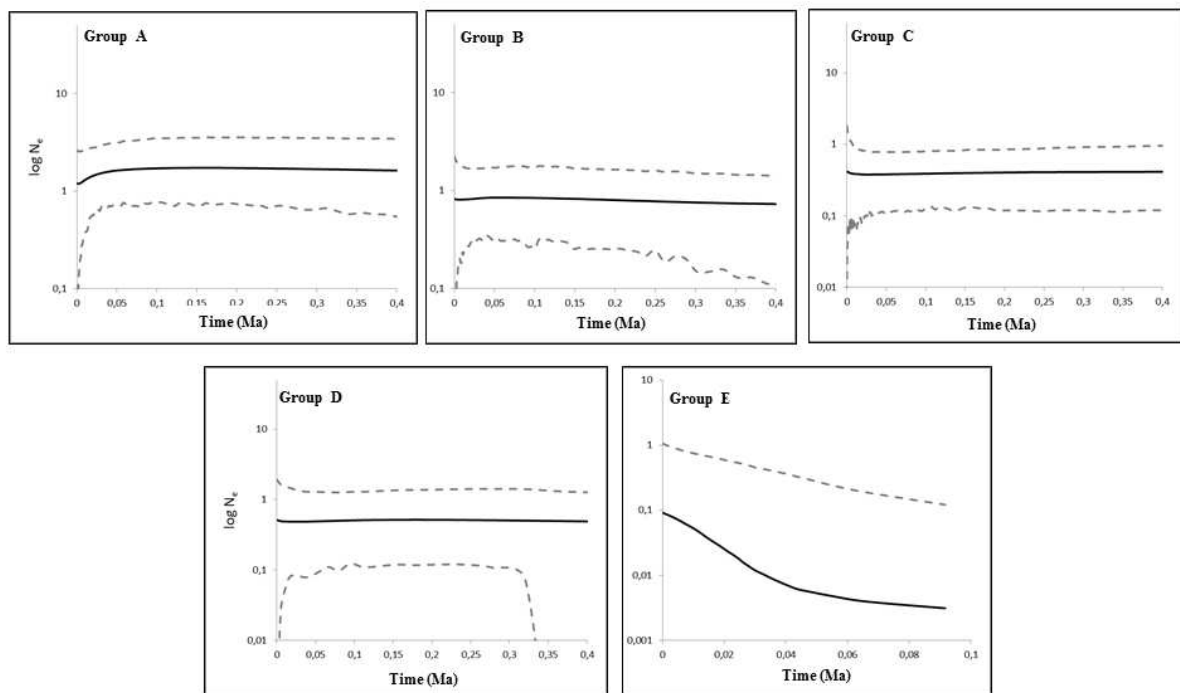


Figure 5. Results of the Extended Bayesian Skyline Plot (EBS) analysis for each genetic group (A – E). The 95% HPD interval is shown in dotted lines.

Demographic model testing for connections between Amazon and Atlantic Forests

The most informative vectors of summary statistics for analysis with Group A comprised nucleotide diversity and diversity among populations (π and π_b , respectively). Within Scenario 3, the models that considered colonization from one rainforest to the other (Models 3 and 4) had similar posterior probabilities, while colonization from DD towards the rainforests was very weakly supported (Table 5 and Fig. 6). We chose Model 3 as the best

Colonization Model once it had higher posterior probability. For the model selection among scenarios, the Panmixia Model had the highest posterior probability, with a very strong Bayes' Factor (Table 5 and Fig. 6). Therefore, Model 1 had the best fit for our empirical data.

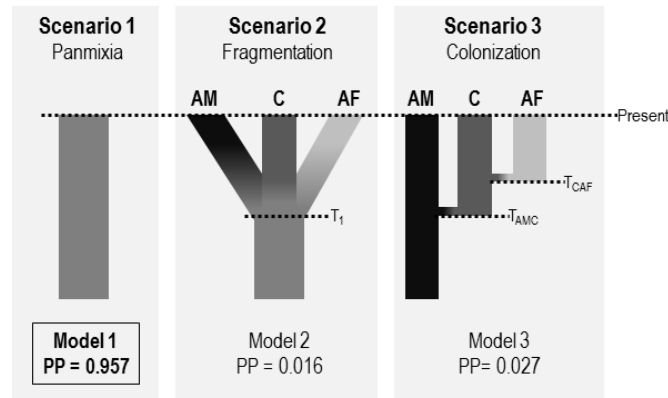


Figure 6. Demographic scenarios tested for Group A. Scenario 1: panmictic population. Scenario 2: single fragmentation event of a past widespread population. Scenario 3: Colonization (three models). τ = divergence times.

Table 5. Model selection within and among scenarios for Group A.

Scenario	Model	Within scenarios		Among scenarios	
		Posterior Probability	Bayes' Factor	Posterior Probability	Bayes' Factor
1 Panmixia	1			0.957	35.024
2 Fragmentation	2			0.016	
3 Colonization	3 (AM to DD then to AF)	0.484	1.025	0.027	
	4 (AF to DD then to AM)	0.472			
	5 (DD to AF and AM)	0.044			

The most informative vectors of summary statistics for analysis with Groups B, D and E comprised diversity within and diversity among populations (π_w and π_b , respectively). Within Colonization Scenarios 3, 4 and 5, the models that considered colonization in different times for each biome (Models 3, 4, 6, 7, 9 and 10) had higher and similar posterior probabilities (Table 6) and the chosen model within each colonization scenario are indicated in Table 6. For the model selection among overall scenarios, the Panmixia Model (1) had the highest posterior probability, with a very strong Bayes' Factor (Table 6 and Fig. 7).

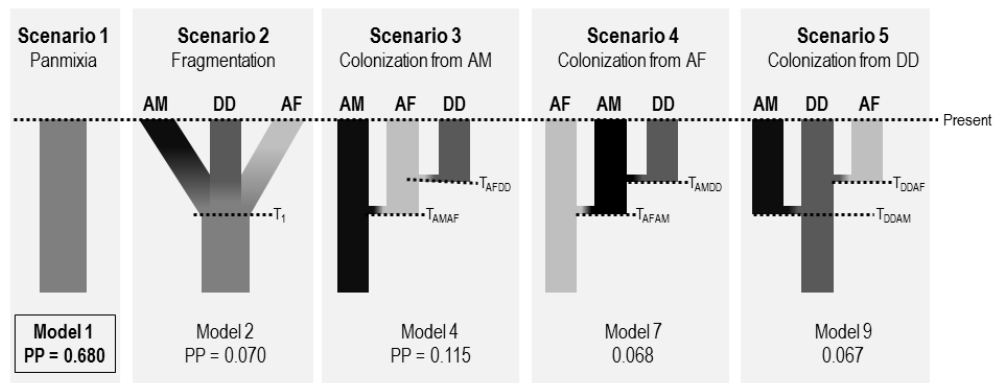


Figure 7. Demographic scenarios tested for the genetic Groups B, D and E. Scenario 1: panmictic population. Scenario 2: single fragmentation event. Scenario 3: colonization from Amazon to Atlantic Forest then to the dry diagonal. Scenario 4: colonization from Atlantic Forest to Amazon then to the dry diagonal. Scenario 5: colonization from dry diagonal to Amazon and Atlantic Forests. τ = divergence times.

Table 6. Model selection within and among scenarios for Groups B, D and E.

Scenario	Model	Within scenarios		Among scenarios	
		Posterior Probability	Bayes' Factor	Posterior Probability	Bayes' Factor
1	1 (Panmixia)			0.680	5.913
2	2 (Fragmentation)			0.070	
3 Colonization from AM	3 (to DD then to AF)	0.436			
	4 (to AF then to DD)	0.438	1.004	0.115	
	5 (to AF and DD)	0.125			
4 Colonization from AF	6 (to DD then to AM)	0.397			
	7 (to AM then to DD)	0.412	1.037	0.068	
	8 (to AM and DD)	0.190			
5 Colonization from DD	9 (to AM then to AF)	0.406	1.041	0.066	
	10 (to AF then to AM)	0.390			
	11 (to AF and AM)	0.203			

Discussion

General considerations

Divergence events among the three *Aglaoctenus* species were dated on Neogene (ca. 5 - 9 Ma). The timing of this diversification is congruent with the retraction of forests and savannization in South America that started during Oligocene due to global cooling and dryness events (Morley, 2000; Zachos *et al.*, 2001). This process possibly contributed to the emergence of the species of this genus. *A. oblongus* is restricted to the subtropical region (Santos *et al.*, 2003), *A. castaneus* presents a disjoint distribution in the two rainforests (AF and AM) and *A. lagotis* is found in several phytophysiognomies (Santos & Brescovit, 2001).

A. lagotis intraspecific analyses revealed five geographically structured lineages that diverged predominantly during Pleistocene (Fig. 5a), an epoch with severe climate oscillations that promoted the structuring of populations and the emergence of new species (Rull, 2008; Rull, 2011). The results are suggestive of distinct ecological tolerances for *A. lagotis* lineages, which, together with evolutionary events, may have a role in their present geographical ranges.

Results for nuclear and mitochondrial markers were congruent but the genetic structure levels were different, what may have been influenced by each type of inheritance (biparental nuDNA and maternal mtDNA) coupled with male-biased dispersal in this species (Santos & Brescovit, 2001). Also, incomplete lineage sorting, a lower mutation rate and a higher populational effective size of the nuclear markers compared to COI can explain these results (Toews & Brelsford, 2012).

Connections between Amazon and Atlantic Forest biomes

The geographical distribution of *A. lagotis* haplotypes suggests putative connections between AM and AF, similar to those proposed by Por (1992) based on floristic data. The presence of haplotypes from the genetic group A in Amazon, DD and AF (Fig. 3) suggests a connection between the rainforests through the DD, supported by the panmixia scenario selected by the ABC analysis and indicates past and/or present connections among the biomes. So, even though this open vegetation corridor may seem to separate populations of forest organisms, our data do not corroborate this picture. This connection route has been evidenced by Ecological Niche Modeling studies (Sobral-Souza *et al.*, 2015) and by phylogeographical analysis of small mammals (Costa, 2003).

The geographical distribution of groups B, D and E (Fig. 2), sister groups in the mitochondrial tree (Fig. 4a), also indicates connectivity between southern AF and eastern AM. Loughheed *et al.* (2013) in a phylogeographical analysis of a neotropical bird also found great similarity between populations located in northeast Argentina and north Brazil, suggesting events of dispersion from Central to South America during Pleistocene as responsible for this pattern. Nevertheless this similarity is intriguing, since most studies link eastern AM to the northern portion of AF as a result of connecting routes between the two forests through the Caatinga biome (Costa 2003; Melo-Santos *et al.*, 2007; Cabanne *et al.*, 2008; Batalha-Filho *et al.*, 2013; Fouquet *et al.*, 2014).

According to our data two connection routes between these biomes are suggested to explain this pattern: one of the routes would have occurred through the DD, in a north-south way, similar to the route suggested for Group A; another route would have connected southern AF and AM through the ecotone Cerrado/Chaco, similar to the one hypothesized by Batalha-Filho *et al.* (2013), and we favor an extended pathway through the eastern side of the Andes. Despite speculative, this latter route is supported by i) the occurrence of *A. lagotis* in Bolivia, Colombia and Venezuela (Santos & Brescovit, 2001); ii) studies that show that several lineages or species that occur in southern AF and in the Andes have close relationships, as demonstrated for plants (Por, 1992; Fiaschi & Pirani, 2009), small mammals (Percequillo *et al.*, 2011), parrots (Ribas *et al.*, 2007) and anurans (Faivovich *et al.*, 2004, 2005). This common pattern may be consequence of orogenic events as discussed by Batalha-Filho *et al.* (2013).

For the demographic model tests about the southern AF and eastern AM connections, the panmixia model was once again selected, and it may have been strongly influenced by the nuclear markers. This model corroborates the idea that DD enables dispersal of *A. lagotis* between the Atlantic and Amazon Forests.

By the other hand, the presence of geographically structured genetic groups points to somehow prolonged periods of isolation. Together, the data suggest that the present range of the DD had experienced a dynamic history, with periods of retraction and expansion of dry and wet phytophysiologicals. They also support the renewed interpretation of the evolutionary history of the Neotropics in which both rainforests, as well as the open vegetation corridor cannot be seen as independent ecological and evolutionary unities, but as complementary and interconnected systems.

Complex phylogeographical patterns in the AF

Important latitudinal discontinuity on the geographical distribution of AF organisms have been reported for amphibians (Lynch, 1979), birds (Cracraft & Prum, 1988; Bates *et al.*, 1998) and reptiles (Vanzolini, 1988), indicating that this biome has a dynamic evolutionary history. More recently this pattern have been corroborated by distributional data of lowland forest mammals (Costa *et al.*, 2000), floristic composition (Por, 1992; Oliveira-Filho & Fontes, 2000) and in phylogeographical analyses with several organisms, generating some hypotheses about the processes that led to this diversification as, for instance, the rivers as barriers, climate oscillations and forest fragmentation and geological events in different periods (Pellegrino *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006; Costa, 2003; Cabanne *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Carnaval *et al.*, 2009; Thomé *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2012). Sobral-Souza *et al.* (2015) showed different climate conditions along AF, corroborating that the Northern and Southern portions represent distinct biogeographical entities and that the climate of the Southern portion is distinct from the Northern and the Amazon.

We also observed a phylogeographical break in AF for *A. lagotis*: the Northern portion has individuals of the widespread Group A while the Southern ones belong to Group B that is predominantly in the subtropical and restricted to AF. These groups are not monophyletic and are evolving independently since late Pliocene. Our data do not support hypothesis that consider the Northern-Southern differentiation as a consequence of events limited in the AF, but point out to a complex history where dispersal from other biomes also play an important role in the establishment of the current biogeographic and phylogeographic patterns.

Martins *et al.* (2009) and Pavan *et al.* (2011) worked with the bats *Desmodus rotundus* e *Carollia perspicillata*, respectively, and found phylogeographical patterns similar to ours in the AF. The location of the latitudinal break is congruent between *A. lagotis* and *D. rotundus* and Martins and colleagues suggested that Pleistocene climate oscillations caused isolation of populations in forest patches during glacial periods. The bat *C. perspicillata* showed a pattern of an exclusive Southern lineage and a widely distributed lineage in the Northern portion, corroborating the idea of distinct events of colonization for the AF.

A previous study of *A. lagotis* in the Brazilian Southeastern region suggested the existence of cryptic diversity (Macrini *et al.*, 2015) where we detected individuals from Groups B and C in sympatry (Fig. 2). This region has been reported as a contact zone for

other organisms such as the bird *Xiphorhynchus fuscus* and the snake *Bothrops jararaca* (Cabanne *et al.*, 2007 and Grazziotin *et al.*, 2006; respectively). For this spider the contact zone coincides with the boundaries of two distinct geomorphological formations, the Peripheral Depression and the Atlantic Plateau. Salis *et al.* (1995) compared floristic composition in forest fragments in these two formations and found great differentiation. Rather than indicating that this neighbor habitats caused local differentiation, our data point to their role as providing distinct suitable conditions for lineages that might have originated elsewhere.

Remarks

Using a widely distributed invertebrate species with restricted dispersion has proven to be appropriate considering our aims, as it was possible to corroborate patterns proposed by previous studies with vertebrates and plants, and to detect particularities of the dynamic evolutionary history of the Neotropical region. Pleistocene climatic oscillations largely influenced *A. lagotis* diversification confirming their importance in structuring the biodiversity in this region. The DD does not seem to be a barrier to dispersal for this spider, and we corroborate the existence of connection routes between the main rainforests of the Neotropical region.

In addition, it was possible to corroborate the AF phylogeographical discontinuity between the tropical and subtropical portions. We reinforced that distinct events, not restricted to this biome, were responsible for this pattern. Studies with a comprehensive sampling design should be priority in studies of historical biogeography in the Neotropical region.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Antonio Domingos Brescovit for the identification of the specimens and to all our friends who helped in the field or with technical support, especially Jair F. Mendes, Thadeu Sobral de Sousa, Célia Bresil and Suzana Diniz. We thank Florencia Fernández Campón, Douglas de Araújo, Estevam L. Cruz da Silva, Milton Kanashiro, Alexandre Bonaldo, Regiane Saturnino and Bruno Rodrigues for their assistance with the sample collections and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for conceding collecting permits (numbers 30635-6 and 37285-1). This work was supported by FAPESP (research Grant 12/02526-7 to VNS and graduate scholarship 2011/17244-4 to FVHMF).

References

- Ab'Saber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* **53**: 1–23.
- Amaro, R.C., Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. & Carnaval, A.C. 2012. Molecular phylogenetics and evolution demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**: 880–888.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* **7**: 371–379.
- Avise, J. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. 2009. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conserv. Genet.* **11**: 665–669.
- Ayoub, N.A. & Riechert, S.E. 2004. Molecular evidence for Pleistocene glacial cycles driving diversification of a North American desert spider, *Agelenopsis aperta*. *Mol. Ecol.* **13**: 3453–3465.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48.
- Batalha-Filho, H., Cabanne, G.S., Miyaki, C.Y. 2012. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 892–902.
- Batalha-filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P. & Miyaki, C.Y. 2013. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J. Ornithol.* **154**: 41–50.

- Bates, J.M., Hackett, S.J. & Cracraft, J. 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of Passerine birds. *J. Biogeogr.* **25**: 783–793.
- Beavis, A.S., Sunnucks, P., Rowel, D.M. 2011. Microhabitat preferences drive phylogeographic disparities in two Australian funnel web spiders. *Biol. J. Linn. Soc.* **104**: 805–819.
- Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* **17**: 3754–3774.
- Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* **7**: 367–369.
- Bidegaray-Batista, L. & Arnedo, M.A. 2011. Gone with the plate: the opening of the Western Mediterranean basin drove the diversification of ground-dweller spiders. *BMC Evol. Biol.* **11**: 317.
- Bidegaray-Batista, L., Ferrández, M.Á. & Arnedo, M.A. 2013. Cladistics Winter is coming: Miocene and Quaternary climatic shifts shaped the diversification of Western-Mediterranean *Harpactocrates* (Araneae, Dysderidae) spiders. *Cladistics* **30**: 428–446.
- Bigarella, J.J., Andrade-Lima, D., Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *An Acad brasil Ciênc* 1975. **47**: 411–464.
- Cabanne, G.S., Fernando, M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Molecular Phylogenetics and Evolution Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 70–83.
- 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. *Biol. J. Linn. Soc.* **91**: 73–84.

- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* **323**: 785–789.
- Cheng, L., Connor, T.R., Sirén, J., Aanensen, D.M. & Corander, J. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 1224–1228.
- Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., *et al.* 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* **46**: 419.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J. & Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* **9**: 539.
- Costa, L.P., Leite, Y.L.R., Fonseca, G.A.B., Tavares, M., Costa, L.P. & Leite, Y.L.R. 2000. Biogeography of South American Forest Mammals: Endemism and Diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* **32**: 872–881.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeogr.* **30**: 71–86.
- Cracraft J. & Prum, R.O. 1988. Patterns and Processes of Diversification: Speciation and Historical Congruence in Some Neotropical Birds. *Evolution* **42**: 603–620.
- Drummond, A.J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **29**: 1969–1973.
- Drummond, G.B. & Vowler, S.L. 2012. Categorized or continuous? Strength of an association-and linear regression. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **36**: 89–92.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.

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. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 564–567.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.

Fagundes, N.J.R., Ray, N., Beaumont, M., Neuenschwander, S., Salzano, F.M., Bonatto, S.L., *et al.* 2007. Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **45**: 17614–17619.

Faivovich, J., Garcia, P.C.A., Ananias, F., Lanari, L., Basso, N.G., Wheeler, W.C. 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **32**: 938–950.

Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A., Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **294**: 1–240.

Fiaschii, P. & Pirani, J.R. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. *J. Syst. Evol.* **47**: 477–496.

Fitzpatrick, S.W., Brasileiro, C. a, Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* **18**: 2877–96.

Foelix, R.F. 2011. Biology of Spiders, 3rd edn. Oxford Univerty Press, New York.

Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Orrico, V.G.D., Lyra, M.L. *et al.* 2012a. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 547–561.

- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro, J., Cecília, R., Camacho, A., *et al.* 2012b. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**: 826–838.
- Fouquet, A., Cassini, C.S., Baptista, F., Pech, N., Rodrigues, M.T., Uyr, C.G., *et al.* 2014. Species delimitation , patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera*. *J. Biogeogr.* **41**: 855–870.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915–925.
- Garrick, R.C., Bonatelli, I.A.S., Hyseni, C., Morales, A., Pelletier, T.A., Perez, M.F., *et al.* 2015. The evolution of phylogeographic data sets. *Mol. Ecol.* **24**: 1164–1171.
- González, M., Peretti, A.V., Viera, C. & Costa, F.G. 2013. Differences in sexual behavior of two distant populations of the funnel-web wolf spider *Aglaoctenus lagotis*. *J. Ethol.* **31**: 175–184.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* **15**: 3969–3982.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**: 591–600.
- Hedin, M.C. & Maddison, W.P. 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily *Dendryphantinae* (Araneae: Salticidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**: 386–403.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Biol.* **8**: 289.

- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., *et al.* 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* **54**: 291–301.
- Ho, S.Y.W. & Shapiro, B. 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol. Ecol. Resour.* **11**: 423–434.
- Hooghiemstra, H. & Hammen, T. Van Der. 1998. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest : the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Sci. Rev.* **44**: 147–183.
- Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., *et al.* 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* **330**: 927–931.
- Hudson, R.R. 2002. Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation. *Bioinformatics.* **18**: 337–338.
- Leigh, J.W. & Bryant, D. 2015. Popart: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction. *Methods Ecol. Evol.* **6**: 1110–1116.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.
- Lougheed, S.C., Campagna, L., Dávila, J.A., Tubaro, P.L., Lijtmaer, D.A., Handfor, P. 2013. Continental phylogeography of an ecologically and morphologically diverse Neotropical songbird, *Zonotrichia capensis*. *BMC Evol. Biol.* **13**: 58.
- Lynch, J.D., 1979. The amphibians of the lowland tropical forests. In: The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal (Duellman, W.E., ed.), pp. 189–215. The Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence.
- Macrini, C.M., Peres, E.A. & Solferini, V.N. 2015. Cryptic diversity of *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest : evidence from microsatellite and

mitochondrial DNA sequence data. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **3**: 9–14.

Magalhaes, I.L.F., Oliveira, U., Santos, F.R., Vidigal, T.H.D.A., Brescovit, A.D. & Santos, A.J. 2014. Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*. *Mol. Ecol.* **23**: 5323–5336.

Martins, F.M., Templeton, A.R., Pavan, A.C.O., Kohlbach, B.C. & Morgante, J.S. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol. Biol.* **13**: 1–13.

Melo-Santos, A.M., Cavalcanti, D.R., Cardoso, M. & Tabarelli, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *J. Biogeogr.* **34**: 437–446.

Morley, R.J. 2000. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **403**: 853–858.

Nei, M. & Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 5269–5273.

Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *BIOTROPICA* **32**: 793–810.

Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. 1995. A study of the origin of Central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinb. J. Bot.* **52**: 41–194.

Pavan, A.N.A.C., Martins, F., Santos, F.R., Ditchfield, A. & Redondo, R.A.F. 2011. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biol. J. Linn. Soc.* **102**: 527–539.

- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2012. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539.
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. & Jr, J.W.S. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol. J. Linn. Soc.* **85**: 13–26.
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Harris, D.J., Yonenaga-Yassuda, Y., Jr., J.W.S. 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**: 446–459.
- Percequillo, A.R., Weksler, M. & Costa, L.P. 2011. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. *Zool. J. Linn. Soc.* **161**: 357–390.
- Peres, E.A., Sobral-Souza, T., Perez, M.F., Bonatelli, I. A.S., Silva, D.P., Silva, M.J., *et al.* 2015. Pleistocene Niche Stability and Lineage Diversification in the Subtropical Spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0121543
- Por, F.D. 1992. Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil. The Hague: SPB Academic Publishing.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253–1256.
- Quattrocchio, M.E., Volkheimer, W., Borromei, A.N.A.M. & Martínez, M.A. 2011. Changes of the palynobiotas in the Mesozoic and Cenozoic of Patagonia: a review. *Biol. J. Linn. Soc.* **103**: 380–396.
- Ribas, C.C., Tavares, E.S., Yoshihara, C. & Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeny and biogeography of yellow-headed and blue fronted parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with reference to the South American taxa. *Ibis* **149**: 564–574.

- Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity (Edinb)*. **106**: 46–57.
- Riddle, B.R. & Hafner, D.J. 2006. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of a core North American warm deserts biota. *J. Arid. Environ.* **66**: 435–461.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552–569.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol. Ecol.* **17**: 2722–2729.
- Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends. Ecol. Evol.* **26**: 508–513.
- Salis, S.M., Shepherd, G.J., Joly, C.A. Floristic Comparison of Mesophytic Semideciduous Forests of the Interior of the State of São Paulo, Southeast Brazil. *Vegetatio* **119**: 155-164.
- Santos, A.J., Álvares, É.S.S. & Brescovit, A.D. 2003. On the third valid species of the genus *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae). *Rev. Ibérica Aracnol.* **8**: 89 – 92.
- Santos, A.J. & Brescovit, A.D. 2001. Lycosidae - A revision of the South American spider genus. *Andrias* **15**: 75–90.
- 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. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651–701.
- Sobral-Souza, T., Lima-Ribeiro, M.S. & Solferini, V.N. 2015. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. *Evol. Ecol.*, doi: 10.1007/s10682-015-9780-9.

- Starrett, J. & Hedin, M. 2007. Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Mol. Ecol.* **16**: 583–604.
- Stefani, V., Del-Claro, K., Silva, L. a., Guimarães, B. & Tizo-Pedroso, E. 2011. Mating behaviour and maternal care in the tropical savanna funnel-web spider *Aglaoctenus lagotis* Holmberg (Araneae: Lycosidae). *J. Nat. Hist.* **45**: 1119–1129.
- Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* **73**: 1162–1169.
- Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 978–989.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585–595.
- 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. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera, F.A. & Alexandrino, J. 2010. Molecular phylogenetics and pvolution phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* **55**: 1018–1031.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* **22**: 1193–1213.
- Vanzolini, P.E. & Williams, E.F. 1981. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Pap. Avulsos Zool.* **34**: 251–255.
- Vanzolini, P.E. 1988. Distributional patterns of South American lizards. In: Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns (P.E. Vanzolini & W.R. Heyer, eds.), pp. 317–

342. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J., eds.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego.

Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* **292**: 686–93.

Zanella, F.C.V. 2011. Evolução da biota da diagonal de formações abertas secas da América do Sul. In: Biogeografia da América do Sul - padrões & processos (Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B., eds), p. 306. Roca, São Paulo.

Capítulo 2:

Padrão filogeográfico de *Aglaoctenus castaneus* (Araneae, Lycosidae) entre as Florestas Atlântica e Amazônica

Introdução

A América do Sul apresenta uma grande diversidade biológica cuja causa é frequentemente atribuída a processos históricos dinâmicos e complexos na região, como oscilações climáticas e tectonismo (Rull, 2008; Hoorn *et al.*, 2010; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011). O soerguimento da Cordilheira dos Andes é apontado como um dos eventos de grande impacto sobre a região sul-americana e teve sua fase de ascensão mais importante durante o Mioceno médio até o Plioceno, apesar do início desse processo orogênico ser anterior (Gregory-Wodzicki, 2000; Hoorn *et al.*, 2010). A elevação desse maciço montanhoso, assim como a redução da temperatura e da precipitação globais característica desse período, favoreceram o desenvolvimento progressivo de uma extensa área com baixos índices de pluviosidade e vegetação aberta na porção central do continente (Morley, 2000; Rull, 2008), constituída atualmente pelos biomas da Caatinga, Cerrado e Chaco (Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011). Essa diagonal de formações abertas secas, ou diagonal seca (DS), situa-se entre as duas grandes florestas tropicais, Atlântica e Amazônica; há evidências de que anteriormente ao seu estabelecimento as formações florestais eram contínuas, formando um cinturão de leste a oeste do continente (Morley, 2000).

A presença de ambientes tão heterogêneos parece ter influenciado de maneira contundente a organização da distribuição dos organismos na América do Sul, e muitos estudos têm sido conduzidos para identificar padrões e tentar elucidar questões acerca da origem da grande biodiversidade atual (Morrone, 2014); porém, estes permanecem em defasagem quando comparados a outras regiões do mundo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013; Beheregaray, 2008).

O estudo de organismos de distribuição disjunta nas duas florestas tropicais pode revelar interessantes episódios sobre a história evolutiva no continente, sobretudo acerca da influência da DS no cenário biogeográfico sul-americano. Essa faixa de vegetação aberta já foi reportada como um fator vicariante, ou seja, uma barreira física à migração de diversos organismos (Cabanne *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; Fouquet *et al.*, 2012a,b); porém, em outros casos, parece atuar como uma “ponte”, possibilitando eventos de dispersão entre as

Florestas Amazônica e Atlântica (Por, 1992; Costa, 2003; Melo-Santos *et al.*, 2007; Batalha-filho *et al.*, 2013; Fouquet *et al.*, 2014).

A filogeografia tem sido utilizada com êxito na compreensão dos eventos históricos envolvidos na diversificação de várias regiões no mundo (Beheregaray, 2008; Hickerson *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Por meio de inferências sobre a distribuição geográfica e temporal da variabilidade genética, é possível compreender a influência de eventos históricos climáticos e geológicos na distribuição da biodiversidade atual, além de verificar a existência de padrões regionais similares, ou seja, investigar se eventos biogeográficos ocorreram de maneira regional e não apenas idiossincrática (Cracraft & Prum, 1988; Avise, 2009).

Estudos filogeográficos com grupos menos conspícuos, como os invertebrados, ainda são incipientes em relação a mamíferos, aves e plantas (Beheregaray, 2008; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013); no entanto, diversas pesquisas realizadas utilizando aranhas revelaram-se muito informativas (e.g. Bond *et al.*, 2001, Ayoub & Riechert, 2004; Crews & Hedin, 2006; Starrett & Hedin, 2007; Snowman *et al.*, 2010; Beavis *et al.*, 2011; Bidegaray-Batista & Arnedo, 2011; Cooper *et al.*, 2011; Kuntner & Agnarsson, 2011; Bidegaray-Batista *et al.*, 2013; Zhang & Li, 2014), dada sua vasta distribuição geográfica, grande riqueza de espécies, diferentes requerimentos ecológicos e capacidade de dispersão. No Brasil apenas dois estudos recentes envolvendo esse grupo de invertebrados foram realizados até o momento, um deles utilizando uma espécie endêmica da Caatinga (Magalhaes *et al.*, 2014), e outro, uma espécie de distribuição subtropical (Peres *et al.*, 2015), contribuindo com importantes considerações sobre a história dessas regiões e os efeitos das oscilações climáticas em organismos menos estudados, o que ratifica sua viabilidade como modelo para entendimento de processos de diversificação nos Neotrópicos.

Na América do Sul, a aranha de teia em funil *Aglaoctenus castaneus* (Araneae, Lycosidae) possui distribuição disjunta nas Florestas Atlântica e Amazônica e não ocorre nos domínios da DS (Santos & Brescovit, 2001). Esse padrão torna-a um bom modelo de estudo para auxiliar no entendimento de questões biogeográficas envolvendo a separação dessas duas florestas neotropicais. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar ferramentas da filogeografia para testar as hipóteses contrastantes de que (i) os indivíduos de *A. castaneus* encontrados em ambas as florestas fazem parte de um único grupo genético, de forma que não existe estruturação entre elas; ou (ii) os indivíduos exibem estruturação genética com linhagens distintas em cada floresta e período de divergência compatível com o estabelecimento da DS. Para tanto, estimativas de diversidade genética, estrutura

populacional, análises demográficas e relações filogenéticas foram inferidas para seis localidades amostradas de *A. castaneus* utilizando-se o marcador molecular mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e o marcador nuclear ribossomal Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2).

Material e Métodos

Coletas e extração do DNA

Foram amostrados 48 indivíduos em seis localidades distribuídas nas Florestas Amazônica e Atlântica (Fig. 1). Obtivemos amostras da região amazônica, no limite da distribuição dessa espécie a oeste do continente, na Estação Biológica Jatun Sacha, localizada no Equador (EQ) (cedida da Coleção Taxonômica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG), e na floresta tropical situada entre as cordilheiras oeste e central da Colômbia (COL). Na Floresta Atlântica foram amostradas duas localidades no Estado de São Paulo: em Cananeia (CANSP) e no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (ICSP); e duas no Rio de Janeiro, em Itatiaia, no Parque Nacional do Itatiaia (ITARJ), e em Silva Jardim, na Reserva Biológica de Poço das Antas (PARJ).

Para a etapa de extração do DNA utilizamos de duas a quatro pernas por indivíduo, que foram macerados em almofarizes com nitrogênio líquido. O kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) foi utilizado seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer (-20°C), e o abdômen e cefalotórax restantes foram conservados em álcool 100%.

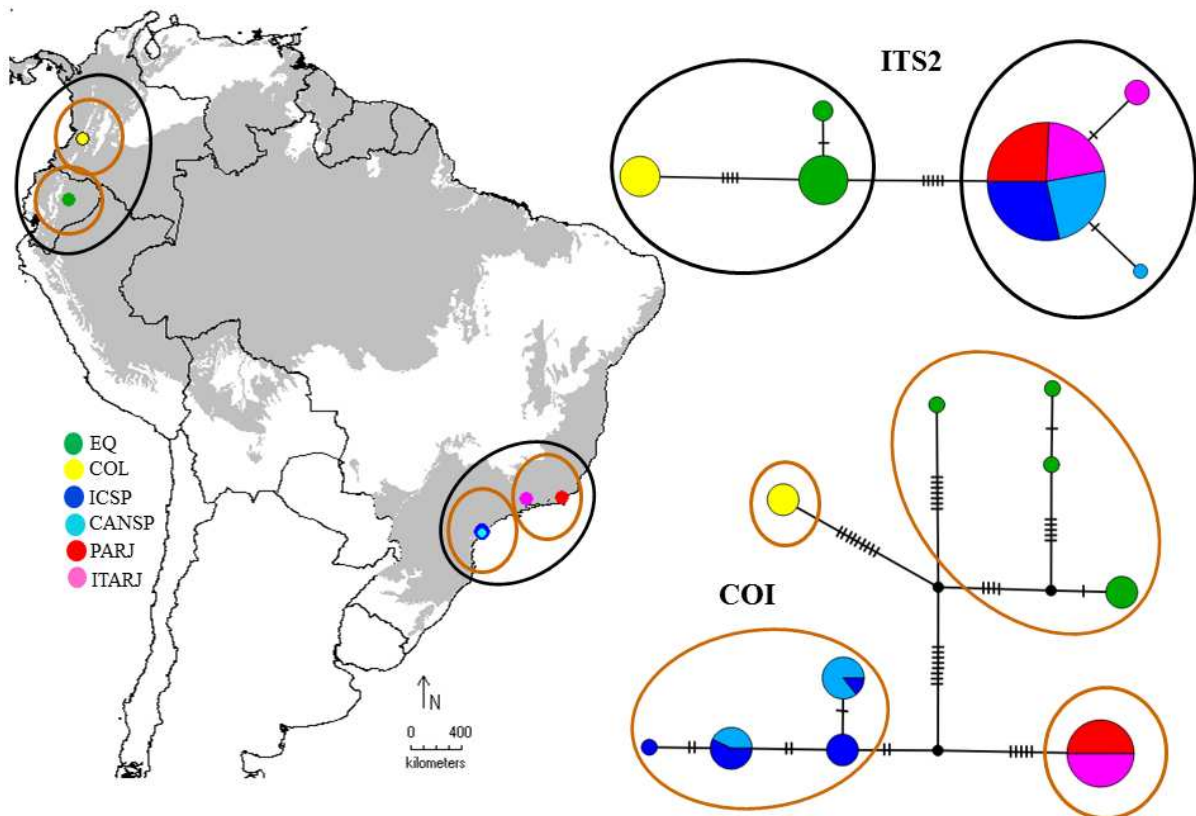


Figura 1. Mapa das localidades de coleta e redes de haplótipos obtidas para *Aglaoctenus castaneus*. Círculos em marrom indicam os grupos genéticos inferidos com o COI (Conjunto I) e círculos em preto indicam os grupos genéticos ITS2 (Conjunto II).

Amplificação e sequenciamento das regiões COI e ITS2

Para a amplificação da região mitocondrial COI, utilizamos os *primers* C1-N-2776 (Hedin & Maddison, 2001) e C1-J-1751 (Simon *et al.*, 1994) nas seguintes condições: 15ng de DNA; 3mM MgCl₂; 0,2mM dNTP; 0,4uM primer e 1U de Taq DNA Polimerase. A ciclagem de temperatura foi padronizada para um início a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; após esses ciclos foi mantida a temperatura de extensão (72°C) por 5 minutos.

Para a amplificação da região ribossomal ITS2, utilizamos os *primers* 5.8S (FITS) e 28S (RITS) que estão descritos em White *et al.* (1990). As condições de amplificação foram as mesmas do COI, e a ciclagem de temperatura, a seguir: 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, com extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações foram sequenciados pelo método Sanger em um sequenciador capilar Prism 377 (Perkin Elmer). As sequências obtidas foram alinhadas com o

algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) e manualmente inspecionadas e editadas no software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Foi realizada uma reconstrução de haplótipos para as sequências ITS2 com sítios heterozigotos no DNAsp 5.1 (Librado & Rozas, 2009) utilizando os algoritmos disponíveis no PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003) com probabilidade posterior mínima de 0,9.

Estrutura populacional, diversidade genética e redes de haplótipos

Realizamos análises bayesianas de estruturação populacional para cada marcador molecular separadamente com o programa BAPS 6.0 (Corander *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2013) e permitimos a determinação do número mais provável de clusters (k) dentro de um intervalo $1 \leq k \leq 20$, repetindo por cinco vezes esse procedimento para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Também realizamos estimativas de Φ_{ST} par-a-par e análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) para investigar a estrutura populacional e calculamos o número de sítios polimórficos (S), diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) utilizando o programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi realizado para verificar correlação estatística entre as distâncias genéticas e geográficas entre as localidades no programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). As redes de haplótipos foram inferidas utilizando-se o algoritmo TCS (Clement *et al.*, 2002) implementado no programa PopART (Leigh & Bryant, 2015).

Análises filogenéticas e tempos de divergência

Inferências filogenéticas bayesianas foram realizadas para cada marcador molecular separadamente com o programa BEAST v1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012), e os modelos de substituição nucleotídica mais adequados para os conjuntos de sequências COI e ITS2 foram o HKY+G e o TN93, respectivamente, selecionados com o programa MEGA v6.0.1 (Tamura *et al.*, 2013), segundo o Akaike Information Criterion (AIC).

O grupo externo foi composto por indivíduos *A. lagotis* e *A. oblongus* para enraizar as árvores. Os tempos de divergência foram estimados considerando um relógio relaxado com taxa de substituição para calibração dos nós e estimativa de tempo de divergência para o COI (taxa média = 0,0125) disponibilizada por Bidegaray-Batista & Arnedo (2011). Para essa análise realizamos 50 milhões e 10 milhões de gerações com amostragens a cada 5.000 e 1.000 simulações para o COI e ITS2, respectivamente. O

programa Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) foi usado para analisar a convergência dos resultados de cada parâmetro, sendo o valor mínimo de ESS (Effective Sample Size) aceito de 200. O programa TreeAnnotator v1.8.0 (disponível no pacote do programa BEAST) foi utilizado para sumarizar as árvores geradas em uma árvore de maior credibilidade que foi visualizada e editada com o programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Análises demográficas

Para verificar a ocorrência de expansão populacional foram realizados testes de neutralidade, D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997), além da análise de *mismatch distribution*, por meio do programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) para as seis localidades e para os grupos genéticos inferidos pela BAPS. Para investigar possíveis flutuações no tamanho efetivo populacional no tempo, foi realizada a análise Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP - Heled & Drummond, 2008) com ambos os marcadores utilizando-se a mesma taxa de substituição para o COI da inferência filogenética, por meio do programa BEAST v1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). Para essa análise foram realizadas de 20 milhões a 100 milhões de gerações, amostradas a cada 2.000 a 10.000 gerações. A convergência dos resultados de cada parâmetro foi analisada no programa Tracer v1.6 e o valor mínimo de ESS aceito de 200. Os resultados foram plotados em gráficos para visualização.

Resultados

Estrutura populacional, diversidade genética e redes de haplótipos

Para as sequências COI e ITS2 obtivemos fragmentos de 519pb e 246pb, respectivamente.

As análises de estrutura populacional bayesiana apontaram diferentes números de grupos genéticos para cada marcador; porém, os resultados foram congruentes (Fig. 2). O número de clusters (k) com maior probabilidade para o conjunto de dados ITS2 foi dois, evidenciando estruturação entre os indivíduos de ocorrência nos biomas da Floresta Atlântica (denominado grupo AF) e Amazônica (denominado grupo AM) (Fig. 1 e 2). Para o COI o número de clusters foi quatro, corroborando a separação entre as florestas evidenciada pelo ITS2, mas mostrando também estruturação dentro dos biomas. Na Floresta Atlântica obtivemos dois grupos: um denominado SP, que inclui os indivíduos das populações CANSP

e ICSP, e outro denominado RJ, com indivíduos das populações ITARJ e PARJ. Na Floresta Amazônica também obtivemos dois grupos, EQ e COL, correspondentes aos indivíduos das localidades amostradas.

As análises subsequentes foram conduzidas tanto para os quatro grupos COI (Conjunto I) quanto para os dois grupos ITS2 (Conjunto II), uma vez que são resultados congruentes.

Localidades	CANSP	ICSP	ITARJ	PARJ	EQ	COL
Conjunto I (COI)	SP		RJ		EQ	COL
Conjunto II (ITS2)	AF				AM	

Figura 2. Diagrama dos resultados da BAPS. A primeira linha indica as localidades amostradas; a segunda linha, os grupos obtidos para o COI (Conjunto I) e a terceira linha, os grupos ITS2 (Conjunto II). Os grupos genéticos estão representados pelas cores e respectivas siglas.

O número total de haplótipos e sítios polimórficos para o COI foi de 10 e 43, respectivamente (tabelas 1 e 2). A reconstrução dos haplótipos ITS2 resultou em 96 sequências e apresentou seis haplótipos e 12 sítios polimórficos. As populações da Colômbia e de Silva Jardim apresentaram apenas um haplótipo para todas as sequências ITS2 analisadas. Os valores de diversidade não apresentaram diferenças expressivas entre as populações ou grupos genéticos: a diversidade haplotípica para o COI variou de 0,5 a 0,8; e de diversidade nucleotídica, entre 0,0028 e 0,0198. O ITS2 apresentou valores mais discrepantes, sendo que as populações e grupos genéticos referentes à Floresta Atlântica apresentaram valores mais baixos (Tabela 2).

Tabela 1. Índices de diversidade genética, testes de neutralidade e resultados das análises de *mismatch distribution* (COI). N = nº de sequências; s = nº de sítios polimórficos; H = nº de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; σ = desvio padrão. Em negrito, valores estatisticamente significativos.

COI	N	s	H	H _d (σ)	π (σ)	D	FS	Mismatch distribution
Cananeia (CANSP)	9	3	2	0,500 (0,12)	0,0028 (0,0021)	1,37	3,00	não unimodal
Ilha do Cardoso (ICSP)	10	5	4	0,733 (0,10)	0,0032 (0,0023)	-0,12	0,25	não unimodal
Itatiaia (ITARJ)	9	0	1	0	0	*	*	*
Silva Jardim (PARJ)	9	0	1	0	0	*	*	*
Equador (EQ)	7	17	4	0,714 (0,18)	0,0121 (0,0074)	-0,52	2,25	não unimodal
Colômbia (COL)	4	0	1	0	0	*	*	*
Total	48	43	10	0,811 (0,04)	0,0198 (0,0022)	-0,02	6,71	não unimodal
Conjunto I								
SP	19	5	4	0,719 (0,053)	0,0033 (0,0022)	0,65	1,29	não unimodal
RJ	18	0	1	0	0	*	*	*
EQ	7	17	4	0,714 (0,180)	0,0121 (0,0074)	-0,52	2,25	não unimodal
COL	4	0	1	0	0	*	*	*
Conjunto II								
AF	37	12	5	0,698 (0,056)	0,0090 (0,0050)	2,00	5,89	não unimodal
AM	11	26	5	0,781 (0,092)	0,0198 (0,0111)	0,75	4,34	não unimodal

Tabela 2. Índices de diversidade genética, testes de neutralidade e resultados das análises de *mismatch distribution* (ITS2). N = nº de sequências; s = nº de sítios polimórficos; H = nº de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; σ = desvio padrão; * = valores não calculados. Em negrito, valores estatisticamente significativos.

ITS2	N	s	H	H _d (σ)	π (σ)	D	FS	Mismatch distribution
Cananeia (CANSP)	18	1	2	0,111 (0,096)	0,0004 (0,0008)	-1,16	-0,79	unimodal
Ilha do Cardoso (ICSP)	20	0	1	0	0	*	*	*
Itatiaia (ITARJ)	18	1	2	0,294 (0,119)	0,0011 (0,0014)	0,02	0,46	não unimodal
Silva Jardim (PARJ)	18	0	1	0	0	*	*	*
Equador (EQ)	14	1	2	0,263 (0,136)	0,0011 (0,0014)	-0,34	0,19	unimodal
Colômbia (COL)	8	0	1	0	0	*	*	*
Total	96	12	6	0,449 (0,058)	0,0106 (0,0015)	0,21	3,16	não unimodal
Conjunto I								
SP	38	1	2	0,052 (0,049)	0,0002 (0,0005)	-1,1	-1,40	unimodal
RJ	36	2	1	0,157 (0,077)	0,0006 (0,0010)	-0,51	-0,12	unimodal
EQ	14	1	2	0,263 (0,136)	0,0010 (0,0014)	-0,34	0,18	unimodal
COL	8	0	1	0	0	*	*	*
Conjunto II								
AF	74	2	3	0,104 (0,048)	0,0004 (0,0008)	-1,21	-2,35	unimodal
AM	22	5	3	0,588 (0,066)	0,0085 (0,0055)	1,61	3,59	não unimodal

O teste de Mantel sugere uma correlação positiva e significativa entre as matrizes de distância genética e geográfica para o marcador COI ($r = 0,9$; $p = 0,006$) e para o ITS2 ($r = 0,89$; $p = 0,03$); porém, como mostra a figura 3, os pontos encontram-se divididos em dois grupos, o que invalida a significância da regressão (Drummond & Vowler, 2012). Portanto, não se pode afirmar que exista isolamento por distância para os dados analisados.

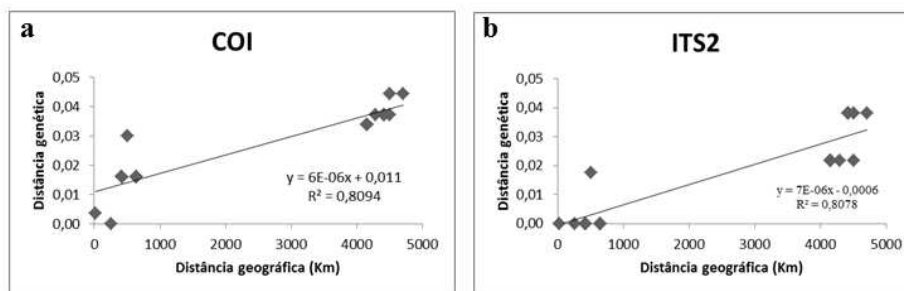


Figura 3. Gráficos de correlação entre distância geográfica (km) e genética (Da) entre as populações amostradas a) Marcador molecular COI; b) Marcador molecular ITS2.

Os valores de Φ_{ST} par-a-par entre localidades para o marcador COI foram altos, variando de 0,74 a 1 (Tabela 3). Para o ITS2, apenas as comparações envolvendo as duas localidades da Floresta Amazônica (EQ e COL) foram significativas, com valores variando de 0,96 a 1 (Tabela 3). Entre os grupos do Conjunto I os valores obtidos foram bastante altos e significativos, com exceção da comparação entre RJ e SP para o ITS2 (Tabela 4). Para o Conjunto II, entre os grupos AM e AF, os valores obtidos foram de 0,67 para o COI e 0,90 para o ITS2. A AMOVA revelou que a maior parte da variação encontra-se entre grupos genéticos, principalmente para o Conjunto I (Tabela 5).

Tabela 3. Valores de F_{ST} entre pares de localidades. Abaixo da diagonal – COI. Acima da diagonal - ITS2. Em negrito, valores significativos.

COI\ITS2	CANSP	EQ	ICSP	ITARJ	PARJ	COL
CANSP	-	0,97	0,01	0,09	0,00	0,99
EQ	0,80	-	0,98	0,95	0,98	0,96
ICSP	0,12	0,79	-	0,13	0,00	1,00
ITARJ	0,91	0,86	0,89	-	0,12	0,98
PARJ	0,91	0,86	0,89	0,00	-	1,00
COL	0,94	0,74	0,93	1,00	1,00	-

Tabela 4. Valores de F_{ST} entre os grupos genéticos do Conjunto I. Abaixo da diagonal - ITS2. Acima da diagonal - COI. Em negrito, valores significativos.

ITS2\COI	SP	EQ	RJ	COL
SP	-	0,82	0,89	0,92
EQ	0,97	-	0,90	0,74
RJ	0,04	0,96	-	1,00
COL	0,99	0,95	0,98	-

Tabela 5. Resultados da AMOVA baseada nas sequências COI e ITS2. Dados hierarquizados de acordo com os Conjuntos I e II. Em negrito, valores significativos.

Fonte da Variação	% da Variação	% da Variação
	COI	ITS2
Conjunto I		
Entre os grupos	88,85	96,62
Entre localidades dentro dos grupos	0,25	0,24
Dentro das localidades	10,9	3,14
Conjunto II		
Entre os grupos	56,26	87,66
Entre localidades dentro dos grupos	34,93	10,44
Dentro das localidades	8,81	1,90

A rede de haplótipos do COI mostrou estruturação entre os biomas florestais analisados e entre regiões das Florestas Atlântica (grupos SP e RJ) e Amazônica (grupos COL e EQ) (Fig. 1). Os indivíduos do Equador possuem quatro haplótipos separados por muitos passos mutacionais, enquanto os da Colômbia apresentam apenas um haplótipo. As duas localidades do grupo SP (CANSP e ICSP) compartilham haplótipos e apenas a população da Ilha do Cardoso apresenta haplótipos exclusivos. As populações do grupo RJ apresentaram o mesmo haplótipo para todos os indivíduos.

A rede de haplótipos do ITS2 (Fig. 1) apresentou congruência com a do COI, evidenciando a separação entre haplótipos de ocorrência na Floresta Atlântica e Amazônica; porém, não se observou a mesma estruturação entre as regiões na Floresta Atlântica (grupos

SP e RJ), sendo um haplótipo muito frequente compartilhado por todas as localidades amostradas nesse bioma. Os indivíduos da Colômbia possuem apenas um haplótipo ITS2, e do Equador, dois haplótipos bastante relacionados.

Análises filogenéticas e tempos de divergência

As árvores obtidas (Fig. 4) indicaram uma divisão em dois clados, um apresentando os indivíduos de ocorrência na Amazônia e o outro na Floresta Atlântica. A divergência entre as amostras da Colômbia e do Equador também é clara em ambas as árvores. No clado referente à Floresta Atlântica observa-se estruturação geográfica para o COI correspondente aos grupos SP e RJ. O ITS2 não apresenta estruturação entre os indivíduos de ocorrência na Floresta Atlântica. Ainda, a datação realizada pelo COI sugere que a diversificação das linhagens ocorreu durante o Pleistoceno (Fig. 4A).

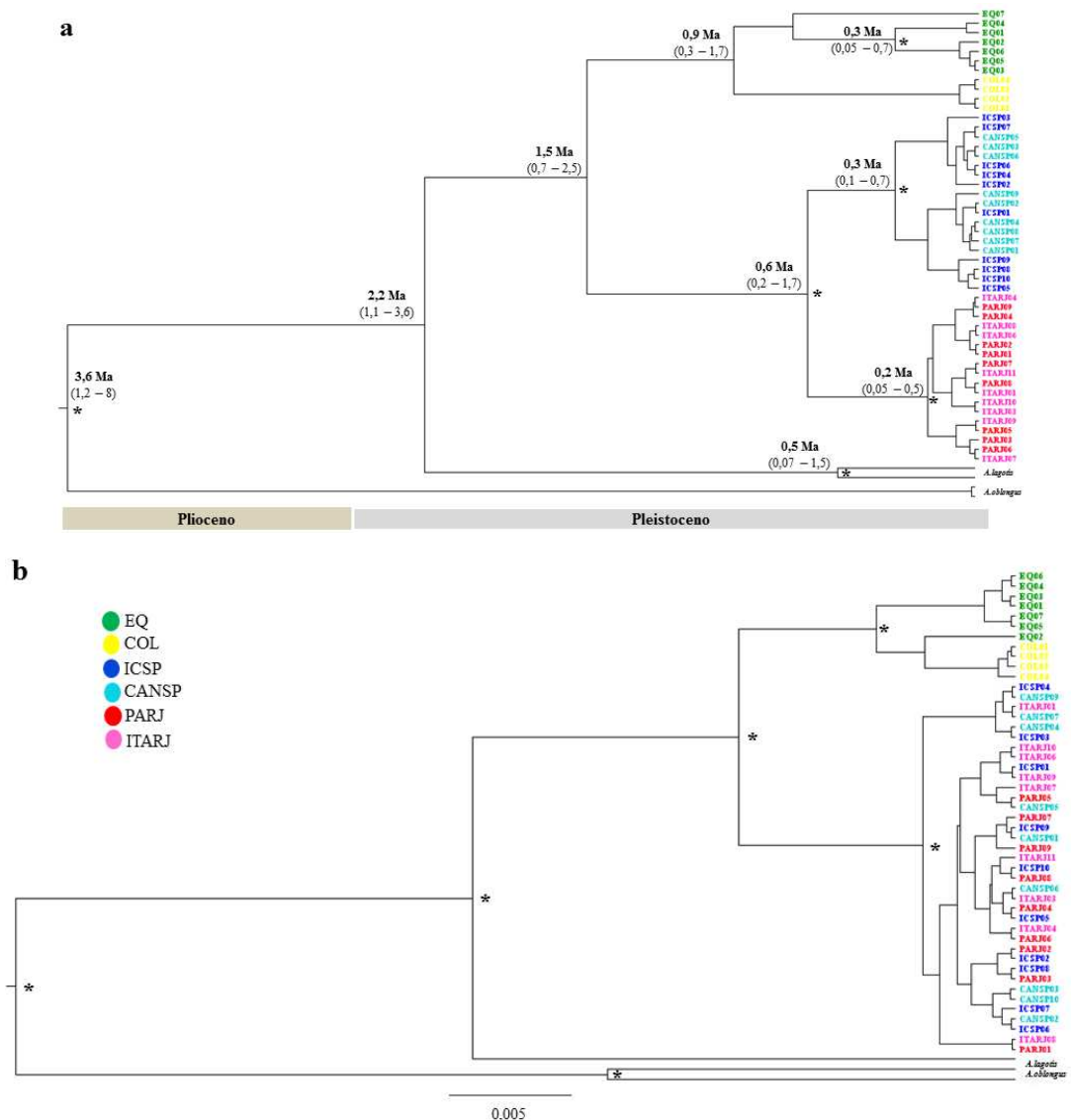


Figura 4. Inferências filogenéticas bayesianas para *Aglaoctenus castaneus*. a) Inferência baseada nas sequências COI com a datação dos principais nós e intervalos de 95% HPD entre parênteses; b) Inferência baseada nas sequências ITS2 em número de substituições nucleotídicas por sítio. Asteriscos informam os nós com probabilidade posterior > 0,9.

Análises demográficas

O teste de neutralidade FS de Fu foi significativo apenas para o ITS2, com sinal de expansão populacional recente para o Conjunto I (grupo SP) e para o Conjunto II (grupo AF) (Tabela 2). As análises de *mismatch distributions* para o COI não indicaram expansão (Tabela 1); para o ITS2 houve sinal de expansão para as populações de Cananéia e Equador e para os grupos SP e RJ (Conjunto I) e grupo AF (Conjunto II) (Tabela 2). Não foram observadas flutuações demográficas históricas em nenhum dos grupos (Fig. 5).

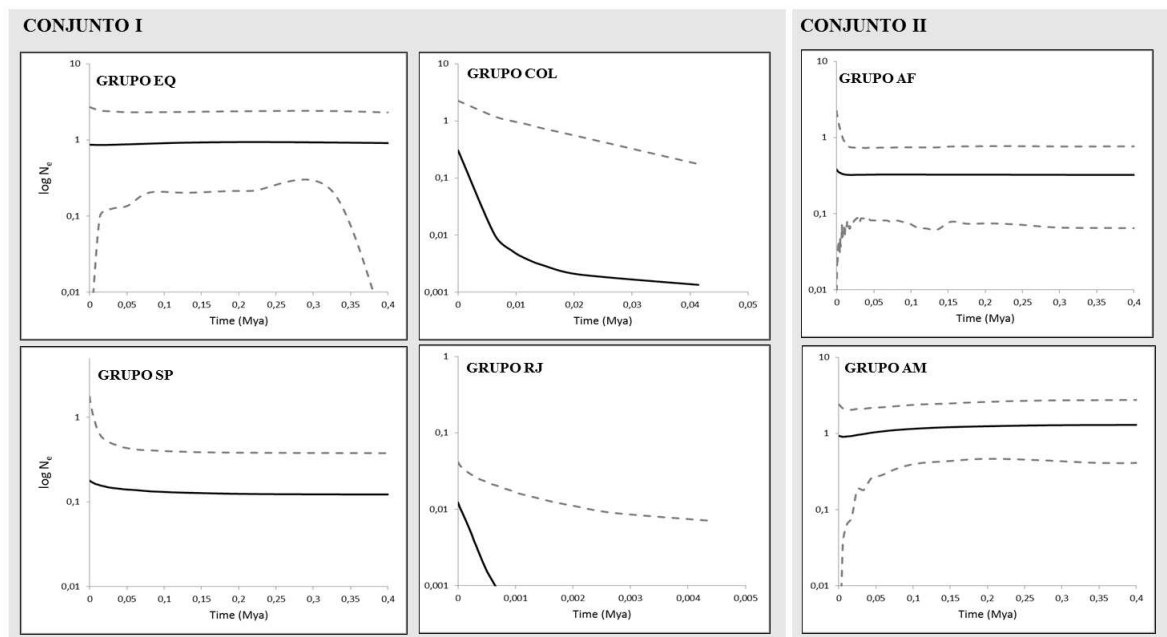


Figura 5. Resultados das análises de EBP para os grupos dos Conjuntos I e II. Linhas tracejadas indicam intervalo de 95% HPD.

Discussão

As formações savânicas correspondentes à Caatinga, ao Cerrado e ao Chaco já foram consideradas importantes barreiras à migração entre as Florestas Amazônica e Atlântica. Os resultados obtidos neste estudo não descartam sua influência sobre a

estruturação genética de *A. castaneus*, podendo sugerir que a estruturação encontrada entre as populações das duas florestas tenha sido causada pelo estabelecimento da DS, ocorrido ao longo do Oligoceno e Mioceno (Simon *et al.*, 2009). No entanto, a datação da divergência entre os clados correspondentes às duas florestas é muito posterior (ca. 0,9 Maa – Pleistoceno inferior), sugerindo a existência de possíveis conexões entre as florestas até o Quaternário, uma vez que essa aranha é frequentemente associada a ambientes florestais (Santos & Brescovit, 2001).

Apesar dos esforços de coleta realizados em diversos pontos de sua distribuição, a amostragem de *A. castaneus* ficou restrita aos extremos de sua distribuição a leste e a oeste do continente (Fig. 1), o que limitou inferências acerca de possíveis rotas de ligação entre as duas florestas neotropicais, como propostas em outros trabalhos (eg. Por, 1992; Costa, 2003; Melo-Santos *et al.*, 2007; Batalha-Filho *et al.*, 2013; Fouquet *et al.*, 2014; Sobral-Souza *et al.*, 2015). O fato de não encontrarmos exemplares dessa aranha em vários locais visitados, a despeito dos registros de ocorrência anteriores, pode indicar alterações recentes em sua distribuição, provocadas por fatores a serem elucidados.

Na Amazônia foi observada estruturação entre as populações da Colômbia e do Equador, localizadas em lados opostos da Cordilheira dos Andes, a aproximadamente 900 km de distância. A região norte dos Andes é um *hotspot* de biodiversidade e endemismo (Myers *et al.*, 2000; Kattan *et al.*, 2004), apresentando segmentação em diferentes cadeias de montanhas com uma história geológica dinâmica e grande variedade de ambientes (Gregory-Wodzicki, 2000). Muñoz-Ortiz *et al.* (2014) apontam dois mecanismos para explicar essa grande biodiversidade, sendo o primeiro relativo aos processos de soerguimento da cadeia andina que ocorreram de forma mais intensa durante o Mioceno (Bates & Zink, 1994; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011) e o outro relativo às oscilações climáticas do Pleistoceno que provocaram mudanças na distribuição de diversos organismos e episódios de fragmentação e isolamento de populações (Lynch *et al.*, 1997; Kattan *et al.*, 2004). A datação da diversificação das linhagens de *A. castaneus* sugere que eventos mais recentes, talvez relacionados às oscilações climáticas do Pleistoceno, tiveram grande impacto sobre sua estruturação genética. De qualquer modo, nossos resultados são concordantes com o padrão geral de biodiversidade da região.

Na Floresta Atlântica os padrões obtidos para os dois marcadores foram contrastantes, sendo que apenas o COI evidenciou estruturação em dois grupos, SP e RJ, localizados na transição entre a região tropical e subtropical. Estudos filogeográficos com diferentes organismos reportaram padrões de descontinuidade e contato secundário nessa

região, o que sugere a ocorrência de eventos históricos regionais (Pellegrino *et al.*, 2005; Cabanne *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009; D'Horta *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2012; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012). Algumas das hipóteses levantadas acerca dessas discontinuidades consideram a presença de rios como barreira ao fluxo gênico, a influência das oscilações climáticas do Pleistoceno que resultaram em isolamento de populações, além de atividades neotectônicas. Os estudos mostram diferenças quanto à localização das quebras filogeográficas e quanto às datas de divergência, corroborando a ideia de que diversos mecanismos foram responsáveis pelo padrão de diversidade na porção sul da Floresta Atlântica e que diferentes organismos apresentam respostas distintas frente às mesmas mudanças ambientais (Costa, 2003; Thomé *et al.*, 2010; Batalha-Filho *et al.*, 2012).

As incongruências relativas ao grau de estrutura genética observada entre marcadores mitocondriais e nucleares foram reportadas para outras espécies de aranhas (Kuntner & Agnarsson, 2011; Magalhães *et al.*, 2014; Peres *et al.*, 2015). Pode ser resultado da dispersão diferencial entre os sexos, de *incomplete lineage sorting* ou, ainda, do menor tamanho populacional efetivo e maior taxa de substituição do marcador mitocondrial (Zink & Barrowclough, 2008; Toews & Brelsford, 2012).

Conclusão

Neste estudo detectamos duas linhagens genéticas para a aranha sul-americana *A. castaneus* relacionadas aos biomas das Florestas Atlântica e Amazônica, cuja divergência foi datada no Pleistoceno. Esse resultado descarta o estabelecimento da DS como um importante evento de isolamento das linhagens das duas porções florestais, indicando a existência de efetivas conexões entre as florestas até o Quaternário. Em cada bioma, as linhagens também apresentaram estruturação, mostrando que eventos em escala regional também contribuíram de forma a moldar o padrão atual de diversidade de *A. castaneus*. Este trabalho é um dos primeiros a utilizar aranhas de ampla distribuição como modelo de estudos filogeográficos; os resultados indicam que esse é um grupo muito promissor e que amostragens compreensivas da distribuição de espécies são fundamentais para compreender a história da biogeografia neotropical.

Referências

- Amaro, R.C., Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. & Carnaval, A.C. 2012. Molecular Phylogenetics and Evolution Demographic processes in the montane Atlantic rainforest : Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**: 880–888.
- Awise, J.C. 2009. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conserv. Genet.* **11**: 665–669.
- Ayoub, N.A. & Riechert, S.E. 2004. Molecular evidence for Pleistocene glacial cycles driving diversification of a North American desert spider, *Agelenopsis aperta*. *Mol. Ecol.* **13**: 3453–3465.
- Batalha-Filho, H., Cabanne, G.S., Miyaki, C.Y. 2012. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 892-902.
- Batalha-filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P. & Miyaki, C.Y. 2013. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J. Ornithol.* **154**: 41–50.
- Bates, J.M. & Zink, R.M. 1994. Evolution into the Andes: molecular evidence for species relationships in the genus *Leptopogon*. *The Auk*, **111**: 507–515.
- Beavis, A.S., Sunnucks, P., Rowel, D.M. 2011. Microhabitat preferences drive phylogeographic disparities in two Australian funnel web spiders. *Biol. J. Linn. Soc.* **104**: 805-819.
- Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* **17**: 3754–3774.
- Bidegaray-Batista, L. & Arnedo, M.A. 2011. Gone with the plate: the opening of the Western Mediterranean basin drove the diversification of ground-dweller spiders. *BMC Evol. Biol.* **11**:

317.

Bidegaray-Batista, L., Ferrández, M.Á. & Arnedo, M.A. 2013. Cladistics Winter is coming : Miocene and Quaternary climatic shifts shaped the diversification of Western-Mediterranean *Harpactocrates* (Araneae, Dysderidae) spiders. *Cladistics* **30**: 428-446.

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*. *Mol. Ecol.* **10**: 899-910.

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. *Biol. J. Linn. Soc.* **91**: 73–84.

Cabanne, G.S., Fernando, M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Molecular Phylogenetics and Evolution Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves : Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 70–83.

Cheng, L., Connor, T.R., Sirén, J., Aanensen, D.M. & Corander, J. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 1224–1228.

Clement, S.M., Walke, P.Q., Posada, D., Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp* **2**:184.

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. 2011. *Mol. Ecol.* **20**: 3219-3236.

Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J. & Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* **9**: 539.

- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeogr.* **30**: 71–86.
- Cracraft J. & Prum, R.O. 1988. Patterns and Processes of Diversification: Speciation and Historical Congruence in Some Neotropical Birds. *Evolution* **42**: 603–620.
- Crews, S.C. & Hedin, M. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: Homalonychus) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* **38**: 470–487.
- 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. *Mol. Ecol.* **20**: 1923–1935
- Drummond, A.J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **29**: 1969–1973.
- Drummond, G.B. & Vowler, S.L. 2012. Categorized or continuous? Strength of an association-and linear regression. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **36**: 89–92.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.
- 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. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Orrico, V.G.D., Lyra, M.L. *et al.* 2012a. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern

emphasizing conservation challenges. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 547–561.

Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro, J., Cecília, R., Camacho, A., *et al.* 2012b. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**: 826–838.

Fouquet, A., Cassini, C.S., Baptista, F., Pech, N., Rodrigues, M.T., Uyr, C.G., *et al.* 2014. Species delimitation , patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera*. *J. Biogeogr.* **41**: 855–870.

Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915–925.

Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geol Soc Am Bull*, **112**: 1091–1105.

Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**: 591–600.

Hedin, M.C. & Maddison, W.P. 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily *Dendryphantinae* (Araneae: Salticidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**: 386–403.

Heled, J. & Drummond, A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Biol.* **8**: 289.

Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., *et al.* 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* **54**: 291–301.

Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., *et al.* 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* **330**: 927–931.

Kattan, G.H., Franco, P., Rojas, V., Morales, G. 2004. Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *J Biogeogr.* **31**: 1829–1839.

Kuntner, M. & Agnarsson, I. 2011. Phylogeography of a successful aerial disperser: the golden orb spider *Nephila* on Indian Ocean islands. *BMC Evol. Biol.* **11**:119.

Leigh, J.W. & Bryant, D. 2015. Popart: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction. *Methods Ecol. Evol.* **6**: 1110–1116.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.

Lynch, J.D., Ruiz-Carranza, P.M. , Ardila-Robayo, M.C. 1997. Biogeographic patterns of Colombian frogs and toads. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **21**: 237–248.

Magalhaes, I.L.F., Oliveira, U., Santos, F.R., Vidigal, T.H.D.A., Brescovit, A.D. & Santos, A.J. 2014. Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*. *Mol. Ecol.* **23**: 5323–5336.

Martins, F.M., Templeton, A.R., Pavan, A.C.O., Kohlbach, B.C. & Morgante, J.S. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol. Biol.* **13**: 1–13.

Melo-Santos, A.M., Cavalcanti, D.R., Cardoso, M. & Tabarelli, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *J. Biogeogr.* **34**: 437–446.

Morley, R.J. 2000. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Morley, R.J. 2000. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Morrone, J.J. 2014. Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, 30: 202-214.

Muñoz-Ortiz, A., Velásquez-Alvaréz, A.A., Guarnizo, C.E., Crawford, A.J. 2014. Of peaks and valleys: testing the roles of orogeny and habitat heterogeneity in driving allopatry in mid-elevation frogs (Aromobatidae: Rheobates) of the northern Andes. *J. Biogeogr.* doi:10.1111/jbi.12409

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **403**: 853–858.

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539.

Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. & Jr, J.W.S. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol. J. Linn. Soc.* **85**: 13–26.

Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Harris, D.J., Yonenaga-Yassuda, Y., Jr., J.W.S. 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**: 446–459.

Peres, E.A., Sobral-Souza, T., Perez, M.F., Bonatelli, I. A.S., Silva, D.P., Silva, M.J., *et al.* 2015. Pleistocene Niche Stability and Lineage Diversification in the Subtropical Spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0121543

Por, F.D. 1992. Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil. The Hague: SPB Academic Publishing.

Posadas, P. & Ortiz-Jaureguizar, E. 2011. Evolução da Região Andina da América do Sul. In: Biogeografia da América do Sul - padrões & processos (Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B., eds), p. 175-188. Roca, São Paulo.

- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol. Ecol.* **17**: 2722–2729.
- Santos, A.J. & Brescovit, A.D. 2001. Lycosidae - A revision of the South American spider genus. *Andrias* **15**: 75–90.
- 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. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651–701.
- Simon, M.F., Grether, R., de Queiroz, L.P. et al. 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *PNAS*, **106**: 20359–20364.
- Snowman, C.V., Zigler, K.S., Hedin, M. 2010. Caves as islands: mitochondrial phylogeography of the cave-obligate spider species *Nesticus barri* (Araneae: Nesticidae). *J. Arachnol.* **38**: 49–56.
- Sobral-Souza, T., Lima-Ribeiro, M.S. & Solferini, V.N. 2015. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. *Evol. Ecol.*, doi: 10.1007/s10682-015-9780-9.
- Starrett, J. & Hedin, M. 2007. Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Mol. Ecol.* **16**: 583–604.
- Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* **73**: 1162–1169.
- Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 978–989.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA

polymorphism. *Genetics* **123**: 585–595.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.

Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera, F.A. & Alexandrino, J. 2010. Molecular phylogenetics and pvolution phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* **55**: 1018–1031.

Toews, D.P.L. & Brelsford, A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol. Ecol.* **21**: 3907-3930.

Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* **22**: 1193–1213.

Zink, R.M. & Barrowclough, G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol Ecol*, **17**:2107–2121.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J., eds.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego.

Zhang, Y. & Li, S. 2014. A spider species complex revealed high cryptic diversity in South China caves. *Mol. Phylogenet. Evol.* **79**: 353-358.

Zink, R.M. & Barrowclough, G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol Ecol*, **17**:2107–2121.

Discussão e Considerações finais

Padrões filogeográficos de *A. lagotis* e *A. castaneus*: considerações biogeográficas

Os padrões filogeográficos das duas espécies de aranhas (Fig. 2) permitiram inferências sobre os processos de diversificação nos Neotrópicos, apresentados em detalhes nos capítulos desta tese.

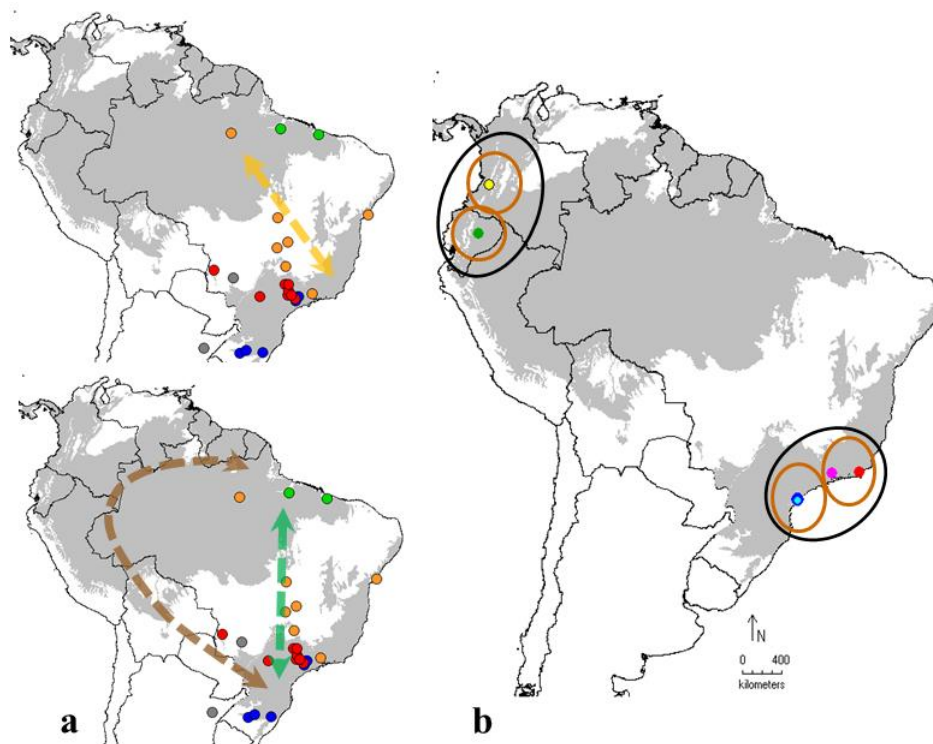


Figura 2. Mapas da América do Sul evidenciando em cinza as áreas correspondentes às Florestas Atlântica e Amazônica. a) Grupos genéticos inferidos para *A. lagotis* e setas em laranja, verde e marrom indicando rotas de conexão sugeridas entre as duas florestas úmidas; b) Grupos genéticos inferidos para *A. castaneus* representados pelos círculos pretos e marrons.

Os resultados também revelaram alguns aspectos em comum, que ressaltam a consistência das interpretações históricas realizadas. Não encontramos indícios de que a formação da diagonal seca tenha resultado em uma separação efetiva e permanente das linhagens das Florestas Amazônica e Atlântica. Nossos resultados mostram conexões entre populações das duas espécies durante o Pleistoceno, posteriores à formação do corredor de

vegetação aberta. Propusemos três rotas de conexões ao longo da diagonal seca (Fig. 2a), que concordam com as aventadas por Por (1992), Costa (2003), Batalha-Filho *et al.* (2013) e Sobral-Souza *et al.* (2015).

Os eventos de diversificação das linhagens intraespecíficas ocorreram principalmente durante o Pleistoceno, um padrão recorrente para muitos grupos (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013) e que reforça a importância dessa época geológica para a estruturação da biodiversidade na região neotropical.

Considerando a Floresta Atlântica, as duas espécies apresentam uma descontinuidade filogeográfica entre as porções tropical e subtropical, que poderia ser interpretada como resultado da fragmentação dessa floresta em períodos de clima mais seco. No entanto, os resultados de *A. lagotis* mostram que esse padrão não representa um evento vicariante restrito às linhagens desse bioma. Os padrões atuais de distribuição de linhagens são o resultado de processos dinâmicos e complexos, de episódios de isolamento e dispersão, mostrando que os biomas neotropicais não constituem unidades independentes dos pontos de vista ecológico e evolutivo.

Nossos dados concordam com o consenso atual de que grandes mudanças orogênicas e climáticas influenciaram a biogeografia neotropical ao longo do tempo. Seus grandes biomas devem ser estudados em uma perspectiva cada vez mais integrada e este estudo mostrou a importância de trabalhar com organismos de ampla distribuição geográfica para reconstruir suas relações atuais e históricas.

Referências

- Ab'Saber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* **53**: 1–23.
- Armijo, R., Lacassin, R., Coudurier-curveur, A., Carrizo, D. 2015. Coupled tectonic evolution of Andean orogeny and global climate. *Earth-Sci. Rev.* **143**: 1–35.
- Auler, A.S. & Smart, P.L. 2001. Late quaternary paleoclimate in semiarid Northeastern Brazil from U-series dating of travertine and water-table speleothems. *Quat Res*, **55**:159–167
- Auler, A.S., Wang, X., Edwards, R.L. et al. 2004. Quaternary ecological and geomorphic changes associated with rainfall events in presently semi-arid northeastern Brazil. *J Quat Sci*, **19**:693–701
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between Populations Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* **7**: 371–379.
- Avise, J. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. 2009. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conserv. Genet.* **11**: 665–669.
- Ayoub, N.A. & Riechert, S.E. 2004. Molecular evidence for Pleistocene glacial cycles driving diversification of a North American desert spider, *Agelenopsis aperta*. *Mol. Ecol.* **13**: 3453–3465.
- Batalha-filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P. & Miyaki, C.Y. 2013. Connections between the

Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J. Ornithol.* **154**: 41–50.

Batalha-Filho, H. & Miyaki, C.Y. 2016. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, doi: 10.1111/jzs.12118.

Beavis, A.S., Sunnucks, P., Rowel, D.M. 2011. Microhabitat preferences drive phylogeographic disparities in two Australian funnel web spiders. *Biol. J. Linn. Soc.* **104**: 805-819.

Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* **17**: 3754–3774.

Behling, H., Arz, H.W., Patzold, J. et al. 2000. Late Quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quat Sci Rev.* **19**:981–994.

Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* **7**: 367–369.

Bidegaray-Batista, L., Ferrández, M.Á. & Arnedo, M.A. 2013. Cladistics Winter is coming : Miocene and Quaternary climatic shifts shaped the diversification of Western-Mediterranean *Harpactocrates* (Araneae, Dysderidae) spiders. *Cladistics* **30**: 428-446.

Bigarella, J.J., Andrade-Lima, D., Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *An Acad brasil Ciênc* 1975. **47**: 411–464.

Brescovit, A.D. 1999. Araneae. Pp. 45-60. In: Brandão CRF, Vasconcelos EM (org.) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX. Fapesp, São Paulo.

Bucher, E.H. 1974. Observaciones ecologicas sobre los artropodos del bosque chaqueno de

Tucuman. *Rev. Fac. Cien. Fis. Nat. Cordoba*. **1**:35–122.

Cabanne, G.S., Fernando, M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Molecular Phylogenetics and Evolution Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves : Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 70–83.

Carstens, B.C. & Richards, C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution*, **61**: 1439-1454.

Coddington, J.A. & Levi, H.W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu Rev Ecol Syst*, **22**: 565-592.

Collevatti, R.G., Rabelo, S.G., Vieira, R.F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Ann. Bot.* **104**: 655-664.

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. 2011. *Mol. Ecol.* **20**: 3219-3236.

Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B. 2011. Biogeografia da América do Sul: padrões & processos, 1st edn. Roca. São Paulo.

Costa, L.P., Leite, Y.L.R., Fonseca, G.A.B., Tavares, M., Costa, L.P. & Leite, Y.L.R. 2000. Biogeography of South American Forest Mammals: Endemism and Diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* **32**: 872–881.

Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeogr.* **30**: 71–86.

De Oliveira, P.E., Barreto, A.M.F., Suguiú, K. 1999. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco

River. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, **152**:319–337

Fiaschi, P. & Pirani, J.R. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. *J. Syst. Evol.* **47**: 477–496.

Foelix, R.F. 2011. *Biology of Spiders*, 3rd edn. Oxford Univerty Press, New York.

Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Orrico, V.G.D., Lyra, M.L. *et al.* 2012a. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 547–561.

Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro, J., Cecília, R., Camacho, A., *et al.* 2012b. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**: 826–838.

Garrick, R.C., Bonatelli, I.A.S., Hyseni, C., Morales, A., Pelletier, T.A., Perez, M.F., *et al.* 2015. The evolution of phylogeographic data sets. *Mol. Ecol.* **24**: 1164–1171.

González, M., Costa, F.G. & Peretti, A.V. 2014. Strong phenological differences between two populations of a Neotropical funnel-web wolf spider. *J. Nat. Hist.* **48**: 2183–2197.

González, M., Peretti, A.V. & Costa, F.G. 2015. Reproductive isolation between two populations of *Aglaoctenus lagotis*, a funnel-web wolf spider. *Biol. J. Linn. Soc.* **114**: 646–658.

González, M., Peretti, A.V., Viera, C. & Costa, F.G. 2013. Differences in sexual behavior of two distant populations of the funnel-web wolf spider *Aglaoctenus lagotis*. *J. Ethol.* **31**: 175–184.

Hooghiemstra, H. & Hammen, T. Van Der. 1998. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest : the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Sci. Rev.* **44**: 147–183.

- Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., *et al.* 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* **330**: 927–931.
- Keeley, J.E. & Rundel, P.W. 2005. Fire and the Miocene expansion of C4 grasslands. *Ecology Letters*, **8**: 683–690.
- Knowles, L.L. & Maddison, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.* **11**: 2623–2635.
- Kuntner, M. & Agnarsson, I. 2011. Phylogeography of a successful aerial disperser: the golden orb spider *Nephila* on Indian Ocean islands. *BMC Evol. Biol.* **11**:119.
- Macrini, C.M., Peres, E.A. & Solferini, V.N. 2015. Cryptic diversity of *Aglaoctenus lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest : evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **3**: 9–14.
- Magalhaes, I.L.F., Oliveira, U., Santos, F.R., Vidigal, T.H.D.A., Brescovit, A.D. & Santos, A.J. 2014. Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*. *Mol. Ecol.* **23**: 5323–5336.
- Melo-Santos, A.M., Cavalcanti, D.R., Cardoso, M. & Tabarelli, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *J. Biogeogr.* **34**: 437–446.
- Moritz, C., Richardson, K.S., Ferrier, S., Monteith, G.B., Stanisci, J., Williams, S.E., *et al.* 2001. Biogeographical concordance and efficiency of taxon indicators for establishing conservation priority in a tropical rainforest biota. *Proc. Biol. Sci.* **268**: 1875–1881.
- Morley, R.J. 2000. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Morrone, J.J. 2014. Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, **30**: 202–214.

- Motta, P.C. 2014. Aracnídeos do Cerrado, 1st edn. Technical Books Editora, Rio de Janeiro.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **403**: 853–858.
- Pavan, A.N.A.C., Martins, F., Santos, F.R., Ditchfield, A. & Redondo, R.A.F. 2011. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biol. J. Linn. Soc.* **102**: 527–539.
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Harris, D.J., Yonenaga-Yassuda, Y., Jr., J.W.S. 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**: 446–459.
- Peres, E.A., Sobral-Souza, T., Perez, M.F., Bonatelli, I. A.S., Silva, D.P., Silva, M.J., *et al.* 2015. Pleistocene Niche Stability and Lineage Diversification in the Subtropical Spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0121543
- Piacentini, L.N. 2011. Three new species and new records in the wolf spider subfamily Sospinae from Argentina (Araneae: Lycosidae). *Zootaxa*, **3018**: 27-49.
- Platnick, N.I. 1995. An abundance of spiders. *Nat Hist*, **104**: 50-53.
- Por, F.D. 1992. Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil. The Hague: SPB Academic Publishing.
- Posadas, P. & Ortiz-Jaureguizar, E. 2011. Evolução da Região Andina da América do Sul. In: Biogeografia da América do Sul - padrões & processos (Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B., eds), p. 175-188. Roca, São Paulo.
- Potter, P.E. & Szatmari, P. 2009. Global Miocene tectonics and the modern world. *Earth-Sci Rev*, **96**: 279–295.
- Prado, C.P.A., Haddad, C.F.B., Zamudio, K.R. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene

population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Mol. Ecol.* **21**: 921-941.

Ramos, K.S. & Melo, G.A.R., 2010. Taxonomic revision and phylogenetic relationships of the bee genus *Parapsaenythia* Friese (Hymenoptera, Apidae, Protandrenini), with biogeographical inferences for the South American Chacoan subregion. *Syst. Entomol.* **35**: 449–474.

Richards, C.L., Carstens, B.C., Knowles, L.L. 2007. Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. *J. Biogeogr.* **34**: 1833–1845.

Riddle, B.R. & Hafner, D.J. 2006. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of a core North American warm deserts biota. *J. Arid. Environ.* **66**: 435–461.

Santos, A.J., Álvares, É.S.S. & Brescovit, A.D. 2003. On the third valid species of the genus *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae). *Rev. Ibérica Aracnol.* **8**: 89 – 92.

Santos, A.J. & Brescovit, A.D. 2001. Lycosidae - A revision of the South American spider genus. *Andrias* **15**: 75–90.

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. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651–701.

Smith, B.T., McCormack, J.E., Cuervo, A.M., Hickerson, M.J., Aleixo, A., Cadena, C.D., et al. 2014. The drivers of tropical speciation. *Nature*, **515**: 406-409.

Sobral-Souza, T., Lima-Ribeiro, M.S. & Solferini, V.N. 2015. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. *Evol. Ecol.*, doi: 10.1007/s10682-015-9780-9.

Starrett, J. & Hedin, M. 2007. Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi*

(Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Mol. Ecol.* **16**: 583–604.

Stefani, V., Del-Claro, K., Silva, L. a., Guimarães, B. & Tizo-Pedroso, E. 2011. Mating behaviour and maternal care in the tropical savanna funnel-web spider *Aglaoctenus lagotis* Holmberg (Araneae: Lycosidae). *J. Nat. Hist.* **45**: 1119–1129.

Stefani, V. & Del-Claro, K. 2014. The effects of forest fragmentation on the population ecology and natural history of a funnel-web spider. *J. Nat. Hist.* DOI: 10.1080/00222933.2014.909068

Toews, D.P.L. & Brelsford, A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol. Ecol.* **21**: 3907–3930.

Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* **22**: 1193–1213.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, **35**: W71–W74.

Wang, X.F., Auler, A.S., Edwards, R.L. et al. 2004. Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature*, **432**:740–743.

Werneck, F.P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quat. Sci. Rev.* **30**: 1630–1648.

World Spider Catalog. 2016. World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 17.5, accessed on 31/07/2016.

Zhang, Y. & Li, S. 2014. A spider species complex revealed high cryptic diversity in South China caves. *Mol. Phylogenet. Evol.* **79**: 353–358.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**Análise filogeográfica de duas espécies do gênero *Aglaoctenus* (Araneae, Lycosidae)**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Fernanda v. Fontes

Nome do(a) aluno(a): Fernanda von Hertwig Mascarenhas Fontes

Assinatura: Solferini

Nome do(a) orientador(a): Vera Nisaka Solferini

Data: Campinas, 12 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise filogeográfica de duas espécies do gênero Aglaoctenus (Araneae, Lycosidae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 12 de agosto de 2016

Assinatura : Fernanda v. Fontes
Nome do(a) autor(a): **Fernanda von Hertwig Mascarenhas Fontes**
RG n.º 44.784.225-0

Assinatura : Solferini
Nome do(a) orientador(a): **Vera Nisaka Solferini**
RG n.º 4.763.396