

TÍTULO:

ESTUDO CITOGÊNÉTICO DE ESPÉCIES DE ARANEAE RESIDENTES DO PARQUE ESTADUAL MATA SÃO FRANCISCO

CAMPUS: Luiz Meneghel-Bandeirantes

CENTRO: Ciências Biológicas

CURSO: Ciências Biológicas (Bandeirantes)

ÁREA CNPQ: Ciências Biológicas (Genética)

RESPONSÁVEL TÉCNICO: Matheus Pires Rincão

INÍCIO: 01/07/2020 **TÉRMINO:** 31/12/2024

RESUMO:

Araneae é uma das mais diversas ordens de animais do mundo, abrangendo aproximadamente 48 mil espécies de aranhas, distribuídos em todos os continentes, com exceção da Antártida. Apesar disso, menos de 2% de suas espécies foram estudadas citogeneticamente, evidenciando uma grande lacuna de conhecimento a cerca desse grupo. Com base nisso, concentrar esforços de estudos em áreas consideradas hotspots de biodiversidades, pode representar um caminho mais eficaz na tentativa de sanar este problema. É nesse sentido, que as Unidades de Conservação apresentam uma grande importância para os estudos citogenéticos, pois constituem os principais remanescentes de Mata Atlântica do Paraná. Entre elas o Parque Estadual Mata São Francisco se enquadra com uma área promissora para a citogenética de aranhas, principalmente pelo fato de haver um levantamento prévio das espécies de aranhas, que nos permitiu identificar que 80% de todas as espécies do Parque não possuem dados citogenéticos, além de abrigar ao menos seis famílias desconhecidas cromossomicamente. O presente projeto tem por intuito analisar o maior número de espécies possível, baseado no único inventário de araneofauna existente para esta Unidade de Conservação, e ampliar essa amostragem incluindo coletas em outras UCs do estados, em parceria com outros projetos já iniciado pelo Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina, contribuindo de forma significativa para o entendimento da evolução dos números diploide e sistemas cromossômicos sexuais dentro deste grupo de animais.

INTRODUÇÃO:

A Mata Atlântica é um hotspot da biodiversidade, com muitas espécies endêmicas Mayers et al. (2000). Desde a colonização do Brasil a Mata Atlantica foi certamente um dos biomas mais devastados, sendo que atualmente restam apenas alguns fragmentos, os quais representam pouco mais de 10% da área originalmente encontrada no Brasil (Ribeiro et al., 2009). O Paraná, por sua vez, abriga uma grande quantidade de fragmentos remanescentes desse bioma, sua vegetação que vai de savana à ombrófila densa abriga uma enorme variedade de animais, muitos ainda não conhecidos, ou pouco estudados, como é o caso da araneofauna do estado.

Silva e Casteleti (2003) definiram as áreas de endemismo que ocorrem na Mata Atlântica e, com base nessa proposta, é possível identificar pelo menos três dessas regiões presentes no Paraná, sendo: (a) Serra do Mar (na região de vegetação ombrófila densa, incluindo também as ilhas presentes na região costeira); (b) Floresta de Araucária (ombrófila mista); e (c) as Florestas de Interior (floresta estacional semi-decidual).

Uma grande parcela desses remanescentes de Mata Atlântica está protegida na forma de Unidades de Conservação (UCs), as quais não possuem praticamente nenhum estudo envolvendo sua araneofauna, de modo que muitas espécies permanecem desconhecidas nessas regiões. Coletas recentes do Laboratório de Citogenética Animal (LACA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), já permitiram identificar a ocorrência de uma possível espécie críptica de aranha, pertencente ao gênero *Trochosa*, família Lycosidae, identificada por meio de alterações no cariótipo, demonstrando que há a necessidade de ampliar o esforço amostral sobre as aranhas do estado, a fim de conhecer sua real biodiversidade. Também permitiram a descoberta uma nova espécie de *Isoctenus* (Ctenidae), atualmente em processo de descrição. O gênero *Isoctenus* é listado como criticamente ameaçado segundo o Portal da Biodiversidade do Instituto Chico Mendes (portaldabiodiversidade.icmbio.gov.br) (SISBIO, 2020). E compõem um dos focos do presente estudo, com 6 das 16 espécies do gênero já analisadas citogeneticamente, fruto do trabalho de membros desse projeto.

Nesse sentido, o Parque Estadual Mata São Francisco, se destaca quanto à possibilidade de pesquisas com aranhas, pois Chavari et al. (2014) realizaram um extenso estudo inventariando as espécies existente nos mais de 800 hectares da UC. Estes autores, identificaram 209 morfoespécies de Araneae, distribuídas em 45 famílias, destas 101 são espécies nominais. Das 45 famílias, seis delas não possuem nenhum dado citogenético

publicado, e das espécies nominais, apenas 18 possuem algum dado cariotípico, ou seja, mais de 80% das espécies inventariadas, e identificadas, por Chavari et al. (2014) não apresentam nem mesmo seu número diploide descrito.

Ainda, ao considerar as 39 famílias presentes no Parque, que possuem ao menos uma espécie citogeneticamente descrita, em muitas delas essas descrições foram feitas para espécies cuja ocorrência se dá em outros continentes, como é o caso de Corinnidae, Selenopidae e Nesticidae (ARAÚJO et al., 2020). Fazendo desta UC um excelente objeto de estudo para a citogenética de aranhas, podendo contribuir de forma significativa com o aumento no número de descrições, bem como no entendimento de mecanismos associados à evolução dos cariótipos nos grupos estudados.

As aranhas constituem um dos mais diversos grupos de artrópodes existente, com mais de 48 mil espécies identificadas. (World Spider Catalog, 2020), mas a identificação das espécies se baseia em caracteres genitais que só se desenvolvem plenamente nos indivíduos adultos, o que impede sua identificação precisa enquanto ainda não atingiram a maturidade (Coddington e Levi 1991). Sendo assim, metodologias mais refinadas como as empregadas na citogenômica e o uso de DNA barcoding, compõem ferramentas promissoras na identificação das espécies e na resolução dos problemas filogenéticos encontrados em Araneae, podem fornecer uma alternativa na identificação das espécies. Permitindo ainda, estudar comparativamente as diferentes populações, identificar possíveis espécies crípticas (Hebert et al., 2003; Galetti Jr et al., 2008; Blagoev et al., 2013).

Conhecer a biodiversidade de um grupo de organismos, tal como sua distribuição geográfica, é a melhor forma de garantir a eficácia das ações de manejo e conservação (Galetti Jr et al., 2008). Não obstante a biodiversidade é um termo abrangente, e deve ser considerada também a diversidade genética existente, uma vez que elas determinam as variações morfológicas observadas entre as espécies (Solé-Cava, 2001; Townsend et al. 2006). Logo, a conservação da biodiversidade, também deve considerar a conservação da diversidade genética encontrada na natureza. Nesse sentido, o presente estudo compõe uma ferramenta taxonômica adicional na identificação das aranhas, bem como de mapeamento das suas características populacionais dentro do estado do Paraná. Ressaltamos ainda que o status de ameaça de muitas espécies está, em partes, atrelado à falta de estudos sobre esses animais, como é o caso de *Isoctenus*, o que faz deste estudo uma importante ferramenta de atualização, principalmente para este gênero.

OBJETIVO(S):

Objetivo geral:

Identificar e caracterizar por meio da citogenômica e DNA barcoding as espécies de Aranhas de unidades de conservação distribuídas em diversas regiões do Estado do Paraná, bem como relatar a presença espécies que ainda não tenham sido registradas no estado, quando observadas em nossas coletas, a fim de compreender melhor a evolução cariotípica dos diversos grupos de aranhas e ampliar e gerar dados sobre a araneofauna residente nas Unidades de Conservação do estado, para o desenvolvimento de estratégias de identificação, manejo e conservação das espécies.

Objetivos específicos:

- Coletar machos e fêmeas de todas as 101 espécies nominais, identificadas por Chavari et al. (2014), residentes do Parque Estadual Mata São Francisco, com ênfase nas espécies e famílias ainda desconhecidas do ponto de vista citogenético;
- Amostrar outras espécies que possam ser identificadas nominalmente, das mais de 100 listadas por Chavari et al. (2014), seja por status taxonômico ainda não resolvido na época, seja por terem sido coletados apenas juvenis;
- Coletar espécies de aranhas em outras Unidades de Conservação do estado do Paraná;
- Descrever o número diploide e o cariótipo das espécies amostradas;
- Descrever o comportamento meiótico em machos e fêmeas, identificando sistemas de cromossomos sexuais, quando presentes;
- Empregar marcadores cromossômicos, como bandeamento C, a fim de localizar regiões de heterocromatina nas espécies analisadas.
- Determinar o padrão de dispersão de diferentes sequências repetitivas isoladas por sequenciamento genômico de baixa cobertura (parceria com a UEL);

- Determinar e depositar no BOLD (<http://www.barcodinglife.org/>) as sequências de COI de todas as espécies coletadas;

- Realizar análises comparativas entre as espécies e as populações a fim de verificar a possível ocorrência de espécies crípticas.

METODOLOGIA:

As coletas serão realizadas em unidades de conservação distribuídas em diferentes regiões do Paraná, sendo: Parque Estadual Mata do Godoy, Parque Nacional do Iguaçu, Parque Nacional de Ilha Grande, Parque Nacional de Superagui, Parque Estadual da Serra da Esperança, Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual do Guartelá, Parque Nacional Saint-Hilaire-Lange, Parque Estadual Rio Guarani, Parque Estadual Pico do Marumbi, Parque Estadual Mata São Francisco. Serão utilizados testículos, ovários, secos intestinais e embriões de aranhas, jovens e adultos.

As coletas serão noturnas e diurnas, realizadas com auxílio de lanternas de cabeça e potes de coleta e por meio da utilização de guarda-chuva entomológico e peneiramento de serra pilheira.

Serão coletados entre 20 e 30 indivíduos de cada espécie, com esse número reduzido para 5 a 10 indivíduos caso alguma espécie seja identificada como ameaçada de extinção. Os espécimes serão armazenados em álcool 70%, em tubos falcon 15 ml ou 50 ml. E serão identificados no Instituto Butantan pelo professor Dr. Antônio Domingos Brescovit, também curador da coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Biológicas, na qual os espécimes serão tombados.

A obtenção de cromossomos meióticos seguirá o proposto por Araujo et al. (2008). A técnica de obtenção de bandas C seguirá Sumner (1972). Coloração com fluorocromos base-específicos cromomicina A3 (CMA3), que detecta regiões ricas em pares de base GC, e 4,6'-diamino-2'-fenilindol (DAPI), que evidencia regiões ricas em pares de base AT, seguirá o protocolo descrito por Schweizer (1980).

sondas de DNAr 18S e de histona H3 estão clonadas em células competentes de *E. coli* (Rincão et al., 2017; 2020) e armazenadas em freezer -80 °C sob responsabilidade do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina. As sondas de

DNAs repetitivos serão obtidas por sequenciamento de baixa cobertura em espécies de Ctenidae, e testada sua aplicabilidade em outras famílias de aranhas.

Obtenção do DNA genômico será realizada por meio de extrações de DNA de *Ctenus ornatus* e *Ctenus medius* utilizando músculo da perna pelo método de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Sambrook e Russell 2006).

A Hibridização Fluorescente In Situ seguirá o proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). Serão utilizadas sondas de DNAr 18S, histona H3 e outras sequências de DNA repetitivo isoladas no sequenciamento. As sondas marcadas com digoxigenina serão detectadas com anti-digoxigenina-rodamina conjugada e as com biotina serão detectadas com Streptavidin – Fluorescein Isothiocyanate Conjugate. As lâminas serão contra-coradas com o corante fluorescente DAPI e observadas em microscopia de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens serão capturadas usando o programa Motic Images Advanced, versão 3.2.

As sequências de citocromo c oxidase subunidade I (COI) serão amplificadas utilizando os primers descritos em Wheeler et al. (2016). As regiões amplificadas serão sequenciadas pelo método de Sanger. A análise do resultado do sequenciamento e a montagem das sequências consenso serão feitas utilizando o programa online Electropherogram Quality Analysis (Togowa e Brigido, 2003). As sequências serão submetidas ao banco de dado BOLD (Ratnasingham e Heber, 2003) (<http://www.boldsystems.org/>).

JUSTIFICATIVA:

É preocupante que um dos mais diversos grupos de animais do planeta, e que possui uma função ecológica tão importante, seja tão pouco estudado do ponto de vista citogenético. O incessante desmatamento de áreas florestais, bem como invasão contínua de animais exóticos, como é o caso do javali no Parque Estadual Mata São Francisco, colocam em risco a biodiversidade de aranhas, antes mesmo que esta venha ser estudada. Além disso, as aranhas compõem um importante modelo de estudos para a origem e evolução de sistemas cromossômicos sexuais, bem como de outras características citogenéticas, principalmente pelo fato de ser possível visualizar com facilidade as células meióticas, característica rara em análises cromossômicas em outros grupos animais, como em vertebrados. No entanto, o estudo da evolução cromossômica necessita de um extenso mapeamento dos processos de diversificação cariotípica, analisando-se grupos de espécies que estejam próximos

filogeneticamente, de modo que o baixo número de espécies com dados citogenéticos nesta ordem dificulta esse tipo de inferência evolutiva. Nesse sentido, o estudo das espécies de aranhas residentes das Unidades de Conservação do estado do Paraná, um dos estados com mais UCs do Brasil, pode contribuir significativamente para diminuir essa lacuna no número de espécies estudadas cromossomicamente, e fornecer pistas sobre padrões evolutivos entre e dentro das famílias de aranhas existentes nos seus remanescentes florestais.

ATIVIDADES:

- (1) Coleta dos espécimes;
- (2) Retirada e fixação das gônadas;
- (3) Envio dos espécimes para depósito em coleção zoológica;
- (4) Caracterização dos cariótipos das espécies;
- (5) Análise do comportamento meiótico e identificação dos sistemas de cromossomos sexuais;
- (6) Mapeamento da distribuição das regiões heterocromáticas;
- (7) Isolamento, sequenciamento e caracterização das sequências de COI das espécies amostradas;
- (8) Produção de Artigos e submissão em periódicos de impacto internacional;

RESULTADOS ESPERADOS:

Com esforços centrados a partir de 2020 no Parque Estadual Mata São Francisco, uma das poucas Unidade de Conservação com levantamento de Araneofauna do estado do Paraná, e visto que das 101 espécies nominais identificadas no Parque (Chavari et al. 2014), apenas 13 possuem alguma descrição citogenética na literatura (Araujo et al. 2020), esperamos que nossa proposta leve a um grande avanço no conhecimento sobre a diversidade citogenética das espécies de aranhas, no estado do Paraná, além de ser importante para o desenvolvimento de estratégias de identificação, manejo e conservação, integrando os dados citogenômicos e moleculares aos taxonômicos. Podendo contribuir com um aumento de mais de 10% no número de espécies com dados citogenéticos no mundo.

As coletas permitiram aumentar o conhecimento sobre as espécies de aranhas que habitam as UCs do estado, além de permitir uma melhor identificação sobre sua distribuição geográfica. As análises voltadas ao grupo *Isoctenus*, devem permitir uma melhor compreensão sobre seus status de conservação, fornecendo dados atuais sobre sua biogeografia, no que se refere à dispersão e características citogenéticas populacionais.

Além disso, no âmbito educacional, o fortalecimento e a consolidação das coletas e das pesquisas de caracterização de aranhas, também permitirão uma melhor formação e capacitação de recursos humanos, nos níveis de iniciação científica (UENP-Campus CLM - Bandeirantes, PR), e mestrado e doutorado (UEL). Ao mesmo tempo o presente projeto visa a carreira científica e tecnológica dos seus componentes, no que se refere a atuar nas ações de pesquisa integradas em citogenômica e genética molecular, tanto em âmbito nacional quanto internacional.

ORÇAMENTO

A maior parte dos materiais de consumo serão fornecidos pelo Laboratório de Citogenética Animal, tais como: corante Giemsa, Fosfato de Sódio, Cloreto de Sódio, Hidróxido de Bário, análogos de base para marcação de sondas, potes de coleta e tubos falcon. Cabendo para aquisição do presente projeto reagentes para PCR e contratação dos serviços de sequenciamento, que serão adquiridos com recursos próprios.

Elementos de Despesas:

Diárias: 00,00

Hospedagem/Alimentação 0,00

Material de Consumo: R\$ 2.000,00

Passagens 0,00

Pessoal 0,00

Bolsas 0,00

Outros Serviços de Terceiros: 2.000,00

Equipamentos e Material Permanente: 00,00

Total: R\$ 4.000,00

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Atividades de Campo	X	X	X	X	X							
Triagem (Citogenética Clássica)		X	X	X	X	X	X					
Hibridização						X	X					
Extração e Sequenciamento						X	X					
Caracterização do COI							X	X				
Revisão Bibliográfica						X	X	X	X	X	X	
Produção de Resumos						X	X	X	X	X	X	
Redação de Artigos Científicos									X	X	X	X

REFERÊNCIAS:

Araujo D., Rheims C.A, Brescovit AD, Cella DM. 2008. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 89-95.

Araujo D., Schneider M.C, Paula-Neto E., Cella D.M. 2020. The spider cytogenetic database. Available in: <www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase>. Accessed in: 15/05/2020.

Blagoev G.A, Nikolova NI, Sobel C.N., Hebert P.D.N., Adamowicz S. 2013. Spiders (Araneae) of Churchill, Manitoba: DNA barcodes and morphology reveal high species diversity and new Canadian records. *BMC Ecol.* 13:44.

Coddington, J. A. & Levi, H. W. (1991). Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual review of ecology and systematics*, 22(1), 565-592.

Chavari, J., Cipola, N., & Brescovit, A. (2014). Records of Spiders (Arachnida: Araneae) of the Parque Estadual Mata São Francisco, Paraná, Brazil. *Check List*, 10, 1435.

Galetti, J.R., et al. 2008. Genética da conservação brasileira. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, p. 244-274.

Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, SL, Dewaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Real Society B*, v. 270, n. 1, p. 313-321.

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142(6), 1141-1153.

Rincão, M.P., Chavari J.L., Brescovit, A.D., Dias, A.L. (2017). Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): Detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comp Cytogenet.*; 11:627–639.

Rincão, M. P., Brescovit, A. D., & Dias, A. L. (2020). Insights on repetitive DNA behavior in two species of *Ctenus* Walckenaer, 1805 and *Guasuctenus* Polotow and Brescovit, 2019

(Araneae, Ctenidae): Evolutionary profile of H3 histone, 18S rRNA genes and heterochromatin distribution. *PloS one*, 15(4), e0231324.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. Cold Spring Harbor Protocols, 1.

Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J.S. (2000). *Practical in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DADAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.*; 27:190–193.

Silva, J. M. C., & Casteleti, C. H. M. (2003). Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook.* CABS and Island Press, Washington, 43-59.

SISBIO. (2020). Lucas Mendes Rabelo em Sistema de Informação em Biodiversidade – SISBIO, disponível no Portal da Biodiversidade (<https://biodiversidade.icmbio.gov.br/portal/>) em 15 de maio de 2020.

Solé-Cava, A. M. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. *Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos*, 172-192.

Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.*; 75:304–306.

Townsend, C. R. (2006). Fundamentos em ecologia. Trad. Gilson Rudinei P. M. 2. ed. Porto Alegre: Artmed.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.

Wheeler, W.C., et al. (2017). The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics.*; 33:574–616.

World Spider Catalog. (2020). World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern.; online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 15/05/2020