

## Projeto

### 1. Plano de Trabalho

---

<b>Edital:</b>	CP 09/2017 Biodiversidade do Paraná
<b>Título:</b>	Estudo evolutivo em espécies de Ctenidae (Araneae): abordagem citogenômica integrada à análise de DNA barcoding.
<b>Protocolo:</b>	48576.511.37750.31082017
<b>Coordenador:</b>	Ana Lúcia Dias
<b>E-mail:</b>	anadias@uel.br
<b>Área de Conhecimento 1:</b>	Ciências Biológicas » Genética » Genética Animal
<b>Área de Conhecimento 2:</b>	
<b>Área de Conhecimento 3:</b>	
<b>Tema de interesse:</b>	
<b>Instituição Executora:</b>	UEL - Universidade Estadual de Londrina
<b>Unidade Executora:</b>	[ Paraná/PR] Sede
<b>Início Previsto:</b>	01/01/2018
<b>Duração:</b>	24 Meses
<b>Cotação da Moeda Estrangeira:</b>	0 , 00

#### 1.1. Arquivos

Nome	Tipo
Projeto Ana Lucia Dias FA FGB 2017.pdf	Anexo I FA FGB 2017

#### Arquivos Sem Modelo

Nome
------

### 2. Plano de Apresentação :

---

#### 2.1. Resumo da Proposta :

A Mata Atlântica é um hotspot da biodiversidade, com muitas espécies endêmicas Mayers et al. (2000). Desde a colonização do Brasil a Mata Atlântica foi certamente um dos biomas mais devastados, sendo que atualmente restam apenas alguns fragmentos que 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 vai de savana (Cerrado) à ombrófila densa (Mata Atlântica) e 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 um grande número de espécies permanece desconhecido nessas regiões. Coletas recentes do Laboratório de Citogenética Animal (LACA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no Parque Nacional do Superagui, já permitiram identificar a ocorrência de pelo menos uma possível nova espécie de aranha, pertencente ao gênero *Isoctenus*, família Ctenidae (ainda em análise no Instituto Butantan), demonstrando que há a necessidade de ampliar o esforço amostral sobre as aranhas do estado, a fim de conhecer sua real biodiversidade. Além disso, o gênero *Isoctenus* aparece como criticamente ameaçado segundo o Portal da Biodiversidade do Instituto Chico Mendes ([portaldabiodiversidade.icmbio.gov.br](http://portaldabiodiversidade.icmbio.gov.br)).

As aranhas constituem um dos mais diversos grupos de artrópodes existente, com mais de 46 mil espécies identificadas. (World Spider Catalog, 2017). O Instituto Butantan guarda registros de ocorrência de 14 espécies de ctenídeos no Paraná, sendo elas: *Viracucha andicola* (Simon, 1906), *Phoneutria nigriventer* (Keyserling 1891), *Ctenus ornatus* (Keyserling 1877), *Ctenus medius* (Keyserling 1891), *Parabatinga brevipes* (Keyserling 1891), *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau 1897), *Toca samba* (Polotow e Brescovit 2009), *Gephyroctenus philodromoides* (Mello-Leitão 1936), *Isoctenus charada* (Polotow e Brescovit 2009), *Isoctenus eupalaestrus* (Mello-Leitão 1936), *Isoctenus herteli* (Mello-Leitão 1947), *Isoctenus segredo* (Polotow e Brescovit 2009), *Isoctenus ordinário* (Polotow e Brescovit 2009), *Isoctenus strandi* (Mello-Leitão 1936).

Ctenidae é uma das mais representativas famílias de aranhas no Brasil (Raizer et al. 2005; Brescovit et al. 2011) com cerca de 515 espécies e 47 gêneros (World Spider Catalog 2017). As aranhas dessa família exibem tamanho corpóreo variando de 4 até 40 milímetros (Polotow e Brescovit 2014), atingindo aproximadamente 20 centímetros de diâmetro considerando o comprimento das pernas. São espécies cursoriais, noturnas e rápidas (Polotow e Brescovit 2014) e são ecologicamente muito importantes, atuando como controladores biológicos relacionados diretamente com a dinâmica populacional de insetos, pequenos anfíbios e até mesmo de outras aranhas (McComirck e Polis 1982). Do ponto de vista socioeconômico, Ctenidae se destaca pelo fato de ser um dos grupos de aranhas que mais provocam acidentes no Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (2017) somente no ano de 2015 foram registrados mais de 3.000 casos.

O posicionamento filogenético de Ctenidae, em relação às outras famílias, é bem definido. Desde a criação da família, a sua monofilia é suportada por um arranjo ocular do tipo 2-4-2, que se somam com caracteres genitais e juntos definem bem todos os membros do grupo (Silva-Dávila 2003). Silva-Dávila (2003) e Polotow e Brescovit (2014) identificaram diversos problemas filogenéticos da família, principalmente dentro do gênero *Ctenus*, que abriga sozinho cerca de 50% das espécies descritas para a família, reconhecendo a necessidade de descrever novos gêneros, que englobem de maneira mais adequada às espécies. Esses dados revelam lacunas no conhecimento da família e levando-se em consideração que apenas aproximadamente 30% das espécies de aranhas do Brasil foram descritas até o momento Brescovit (1999), demonstra a diversidade de ctenídeos está ainda subestimada.

A identificação das espécies de aranhas se baseia em caracteres genitais, epígenos e pedipalpos 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 Ctenidae, e independem do estágio de desenvolvimento do indivíduo. Permitindo estudar comparativamente as diferentes populações, e a identificar possíveis espécies crípticas (que são espécies morfológicamente semelhantes ou idênticas, porém constituindo unidades evolutivas independentes com isolamento reprodutivo total ou parcial), sendo a correta identificação destas espécies de suma importância para as ações de conservação (Galetti Jr et al., 2008).

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. 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; Santos et al., 2009; Townsend et al. 2006). Logo, a conservação da biodiversidade, também deve ser considerar a conservação da diversidade genética encontrada na natureza.

Das cinco subfamílias aceitas atualmente, quatro possuem alguma espécie cariotipada: Acantheinae, Acanthoetinae, Viridasiinae e Cteninae (Chen, 1999; Araujo et al., 2014; Araujo et al., 2017; Rincão et al., 2017, in press). O sistema cromossômico sexual (SCS) varia entre X1X20 e X1X2X30. Os números diploides observados na família até o momento são  $2n= 22, 28$  e  $29$  (Chen, 1999; Araujo et al., 2014; Kumar et al., 2016; Rincão et al., 2017, In press), e o uso de técnicas moleculares mais avançadas como a hibridização in situ só foram empregadas em Ctenidae recentemente, com a identificação de regiões de DNAr 18S (Rincão et al., 2017, in press)

O DNA barcoding tem por intuito utilizar um ou mais genes, a fim de conseguir delimitar individualmente cada espécie. O gene mitocondrial que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase (COI) é o mais empregado nessa metodologia, pois traz resultados altamente precisos. O DNA barcoding é considerado uma ferramenta taxonômica adicional e sua utilização vem sendo frequente em vários grupos de animais (Hebert et al., 2003; Garcia-Morales e Elias Gutierrez, 2013 ; Cai et al., 2015; entre outros ).

Diversos autores já demonstraram a importância da caracterização de aranhas com COI, principalmente no que diz respeito à identificação de espécies crípticas, com os valores de divergência intraespecífica, em geral, abaixo dos 3%, e de divergência interespecífica acima dos 6% (Robinson et al., 2009; Blagoev et al., 2013, Macrini et al., 2015; Agnarsson et al., 2016), demonstrando que este é um marcador genético confiável no que diz respeito à identificação individual das espécies de aranhas.

As maiores críticas quanto à utilização do DNA barcoding, é quanto à utilização de um único gene na identificação das espécies, e quanto à capacidade destes em determinar níveis mais profundos de relações entre as mesmas (Moritz e Cicero, 2004). Assim, uma forma de utilizar o DNA barcoding com maior eficácia é aliar estas análises com outras metodologias, como análises morfológicas e ou citogenômicas como proposto por este projeto de pesquisa.

## **2.1 . Palavras-Chave :**

citogenética, FISH, COI, sondas de DNA repetitivo

## **2.3 . Síntese do Projeto :**

As espécies de Ctenidae constituem um dos principais grupos de aranhas do Brasil, presentes em diversos nichos e com espécies de interesse médico. Além disso, essa família têm uma importante função ecológica no controle biológico de diversos grupos animais. A família possui uma série de problemas filogenéticos ainda não resolvidos, além de gêneros muito pouco estudados e com risco de extinção. A baixa amostragem juntamente com os impasses filogenéticos, sugerem que a biodiversidade desse grupo é ainda muito subestimada, o que torna difícil determinar o nível de ameaça das suas espécies. A citogenômica tal como o DNA barcoding por COI são ferramentas promissoras no que diz respeito à caracterização individual das espécies. Poucos estudos citogenéticos foram realizados envolvendo a família Ctenidae, sendo que apenas 8 das mais de 500 espécies possuem algum dado cariotípico, que envolvem apenas citogenética convencional. No entanto a utilização de técnicas moleculares mais avançadas, principalmente a hibridização fluorescente in situ (FISH) fornecem resultados mais precisos na caracterização das espécies. Integrando a citogenômica com o DNA barcoding, e aliando esses dados com estudos de filogenética e ecologia descritos na literatura, esperamos poder caracterizar melhor as espécies que ocorrem nas dependências das Unidades de Conservação estudadas, além de conseguir identificar também espécies ainda não descritas, que venham a ser amostradas durante as coletas. Permitindo assim um maior conhecimento do número de espécies de Ctenidae que ocorrem no Paraná, sua distribuição pelo Estado, e entender um pouco mais da evolução citogenômica que envolve a família.

## **2.4 . Objetivos Gerais :**

Identificar e caracterizar por meio da citogenômica e DNA barcoding as espécies de Ctenidae de 10 unidades de conservação distribuídas em diversas regiões do Estado do Paraná, bem como espécies que ainda não tenham sido registradas no estado, a fim de compreender melhor a evolução cariotípica desse grupo de aranhas além de ampliar e gerar dados sobre a araneofauna residente nas Unidades de Conservação, para o desenvolvimento de estratégias de identificação, manejo e conservação das espécies.

## 2.5 . Metodologia :

### Materiais

As coletas serão realizadas em 10 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.

Serão utilizados testículos, ovários, secos intestinais e embriões de aranhas, jovens e adultos, da família Ctenidae. As coletas serão noturnas, realizadas com auxílio de lanternas de cabeça e potes de coleta. Além disso, guias serão contratados entre a comunidade local, visando não só a otimização das coletas, mas também uma primeira integração das comunidades com a pesquisa científica.

Os espécimes serão armazenados em álcool 96%, em tubos falcon 15 ml. E serão identificados no Instituto Butantan pelo professor Dr. Antônio Domingos Brescovit, também curador da coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Biológicas.

### Obtenção dos cromossomos meióticos e coloração convencional

A obtenção de cromossomos meióticos seguirá o proposto por Araujo et al. (2008). As lâminas serão feitas com um fragmento do tecido retirado, imerso em ácido acético 60% e fixado na lâmina com auxílio de uma chapa quente. As lâminas serão coradas com solução de Giemsa 3%., e fotografadas.

### Detecção das regiões de heterocromatina constitutiva (bandeamento C)

A técnica de obtenção de bandas C seguirá Sumner (1972), com algumas modificações. As lâminas são tratadas com ácido acético 20% para romper as ligações fosfo-diéster, em seguida tratadas em solução de hidróxido de bário, para retirada das bases, e por fim em solução salina (2xSSC) para estabilizar o cromossomo. As lâminas serão coradas 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 (Schweizer 1980).

### Obtenção das sondas de DNA e marcação

As sondas de DNAr 18S e de histona H3 estão clonadas em células competentes de E. coli (Rincão et al., 2017, in press) e armazenadas em freezer -80 sob responsabilidade do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina. As sondas de DNAs repetitivos serão obtidas pela metodologia do Cot-1 segundo Zwick et al. (1997) . Todas as sondas serão marcadas pelo kit Nick translation seguindo as instruções do fabricante.

### Obtenção dos DNAs repetitivos pelo Cot-1

Serão realizadas extrações de DNA de *Ctenus ornatus* e *Ctenus medius* utilizando músculo da perna pelo método de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Sambrook e Russell 2006).

O Cot-1 (DNA enriquecido por sequências de DNA alta e moderadamente repetitivo) será realizado seguindo o protocolo descrito por Zwick et al. (1997) utilizando o DNA genômico livre de RNA, obtido de *Ctenus ornatus* e *C. medius*. O DNA concentrado a 500 ng/μL em solução 0,3 M de NaCl em tubos de 1,5 mL serão submetidos a 3 ciclos de autoclavagens de 5 minutos cada (a ajustar). Os fragmentos de DNA gerados deverão conter entre 100 e 1000 pb, a serem confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. O tempo da reação de reanelamento será calculado seguindo a fórmula  $C_0t = 1 = \text{mol/L} \times T$ , onde  $C_0$  é a concentração inicial, calculada em mols de nucleotídeos por litro, e o tempo é dado em segundos. Será assumido que o peso molecular para 1 mol de deoxinucleotídeo monofosfatado é de

339 g/mol. Será utilizado S1 nuclease a uma concentração de 1 U por micrograma de DNA. As alíquotas serão submetidas a banho-maria a 95°C por 10 minutos, com intuito de promover a desnaturação do DNA, em seguida as alíquotas serão mantidas em gelo por 10 segundos, após esse tempo, as amostras serão mantidas em banho a 65°C de acordo com o tempo de reassociação calculado. Após esse tempo será adicionado a S1 nuclease por 8 min, a fim de degradar as fitas simples de DNA que ainda estão presentes nas amostras. O DNA será então extraído pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2006), e eluído em água ultrapura a -20°C.

O DNA obtido será marcado e utilizado como sonda na hibridizado in situ no genoma das espécies das quais foram extraídos, a fim de confirmar sua confiabilidade. As diferentes bandas obtidas em gel de agarose 1,2% serão isoladas em gel de agarose com auxílio do Kit PureLink™ Quick Gel Extraction. Os fragmentos serão clonados com um Kit de clonagem Topo Cloning em linhagem de células competentes de E. coli TOP10 e enviada para sequenciamento.

#### Microdissecção dos cromossomos sexuais e obtenção da sonda cromossômica

A Microdissecção cromossômica será realizada utilizando o microscópio invertido (Olympus® IX71), equipado com microdissector mecânico (Narishige® ONE-3). As agulhas serão preparadas utilizando capilares, com pontas de aproximadamente 0,7 µm no 'micropipette puller' (Narishige® PC-10), sendo retirados de 3 a 12 cromossomos, que serão amplificados e marcados com o auxílio dos kits WGA 4 (Genomeplex Single Cell Whole Genome Amplification Kit) e WGA 3 (Genomeplex Whole Genome Amplification Reamplification Kit), conforme a especificação do fabricante.

#### Dot blot

Para conferir a qualidade das sondas marcadas será realizado o procedimento do Dot Blot. Dois microlitros (2µL) da sonda marcada será aplicado em uma membrana de nitrocelulose pré-tratada com o Tris-HCl 1M e NaCl 3M (tampão 1). Após, a membrana com a sonda será tratada com uma solução bloqueadora contendo Tris-HCl 1M, NaCl 3M e leite em pó desnatado (tampão 2). Para a reação de detecção a membrana será colocada em uma solução contendo Tris-HCl 1M, NaCl 3M e os anticorpos estreptavidina AP e/ou antidigoxigenina AP de acordo com a molécula que foi utilizada para marcar a sonda. Por fim a membrana será imersa em uma solução contendo Tris-HCl 1M, NaCl 3M e MgCl<sub>2</sub> 1M (tampão 3) e após colocada em uma solução contendo os substratos para a reação da fosfatase alcalina (NBT e BCIP).

#### Hibridização Fluorescente in Situ (FISH)

A Hibridização Fluorescente In Situ seguirá o proposto por Pinkel (1986), com modificações sugeridas por Gouveia et al. (2013). Serão utilizadas sondas de DNAr 18S e histona H3 provenientes de *Ctenus ornatus*. 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.

#### DNA barcoding utilizando COI

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 Brígido, 2003). As sequências serão submetidas ao banco de dado BOLD (Ratnasingham e Heber, 2003) (<http://www.boldsystems.org/>). Nesse mesmo banco de dados será utilizado a ferramenta BOLD-IDS para verificar a similaridade das sequências obtidas com outras sequências já depositadas no banco de dado. As sequências com melhor correspondência para cada taxon (quando possível comparar) serão incorporadas nas análises de distância genética intraespecíficas e interespecíficas, baseada no modelo Kimura-2-Parâmetros (Kimura, 1980). O mesmo modelo deve ser utilizado para as análises de Neighbor-Joining, que serão realizadas no programa MEGA v7.0 (Kumar et al. 2016).

## 2.6 . Resultados Esperados :

As amostragens realizadas nos parques e reservas do estado Paraná permitirão auxiliar na determinação do risco de extinção das espécies, por meio da geração de dados de ocorrência e distribuição desses ctenídeos, além de permitir às UCs conhecerem um pouco mais da sua biodiversidade. Os dados gerados com a execução do projeto permitirão também o estabelecimento de parcerias entre pesquisadores de aracnídeos do Paraná e dos demais estados brasileiros, consolidando parcerias entre as universidades e as instituições de pesquisa voltadas ao estudo citogenético, taxonômico e evolutivo das aranhas, de forma a fortalecer as linhas e grupos de pesquisa envolvidos.

Assim, esperamos que nossa proposta leve a um grande avanço no conhecimento sobre a diversidade das espécies de Ctenidae 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. O fortalecimento e a consolidação das coletas e das pesquisas de caracterização de aranhas, também permitindo uma melhor formação e capacitação de recursos humanos (nos níveis de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado). 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.

## 2.7 . Referência Bibliográfica :

Agnarsson I, LeQuier SM, Kuntner M, Cheng R, Coddington JA, Binford G. 2016. Phylogeography of a good Caribbean disperser: *Argiope argentata* (Araneae, Araneidae) and a new 'cryptic' species from Cuba. *ZooKeys* 625: 25-44

Araujo D, Rheims CA, 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, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM. 2014. Comparative cytogenetics of seven Ctenidae species (Araneae). *Zoological Science* 31: 83-88.

Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. 2017 The spider cytogenetic database. Available in: < [www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase)>. Accessed in : 20/08/2017.

Blagoev GA, Nikolova NI, Sobel CN, Hebert PDN, Adamowicz S. 2013. Spiders (Araneae) of Churchill, Manitoba: DNA barcodes and morphology reveal high species diversity and new Canadian records. *BMC Ecol.* 13:44.

Brescovit AD. 1999. Araneae. In: Brandão CRF, Vasconcelos EM, editors. *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX*, São Paulo: Fapesp: 45- 56.

Brescovit AD, Oliveira U & Santos AJ. 2011. Aranhas (Araneae, Arachnida) do estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. *Biota Neotropica* 11: 717-747.

Cai Y, Zhang L, Wang Y, Liu Q, Shui Q, Yue B, Zhang Z, Li J. 2015. Identification of deer species (Cervidae, Cetartiodactyla) in China using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI). *Mitochondrial DNA*.

Chen SH. 1999. Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). *Zoological Studies* 38: 423-434.

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.

Foelix RF (2011) *Biology of spiders*. New York. Oxford University Press. 3: 3-48.

- Galetti JR, P. M.; 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.
- Garcia-Morales AE, Elias-Gutierrez M. 2013. DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Research*, 13:1097–1107
- Gouveia JG, Moraes VPO, Sampaio TR, Rosa R, Dias AL. 2013. Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Review in Fish Biology and Fisheries* 23:215-227.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 270, n. 1, p. 313-321, 2003.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.
- Kumar AS, Venu G, Jayaprakash G, Venkatachalaiah G (2016) Studies on chromosomal characteristics of *Ctenus indicus* (Gravely 1931) (Araneae: Ctenidae). *The Nucleus*. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0191-2>.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 33:1870–1874.
- Macrini, C. M. T., 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. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 3, 009-014.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- McKomic S, Polis GA. 1982. Arthropods that prey on vertebrates. *Biological Reviews* 57: 29-58.
- Ministérios da Saúde. 2015. SISNAM. Available in: <<http://www.saude.gov.br/sinanweb>>. Accessed in: 10/03/2015.
- Moritz C, Cicero C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOS Biology*, v. 2, n. 10: e354.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl AcadSci USA* 83:2934–2938.
- Polotow D, Brescovit AD. 2014. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 170: 333-361.
- Raizer J, Japyassú HF, Indicatti RP, Brescovit AD. 2005. Comunidade de aranhas (Arachnida, Araneae) do pantanal norte (Mato Grosso, Brasil) e sua similaridade com a araneofauna amazônica. *Biota Neotropica* 5: 1-16.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([http://www. barcodinglife. org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Resources*, 7: 355-364.
- Ribeiro MC, Metzger JP., Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142: 1141-1153.

- Rincão MA, Chavari JL, Brescovit AD, Dias AL. 2017, In press. Cytogenetic Analysis of Five Ctenidae species (Araneae): detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comparative Cytogenetics*.
- Sambrook J, Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1.
- Santos FR, Lacerda DR, Redondo RAF, Nascimento AMA, Chartone E, Borba E, Ribeiro RA, Lovato MB. 2009. Diversidade Genética. In: Drumond, G. M.; Martins, C. S.; Greco, M. B.; Vieira, F. (Org.). *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais subsídio para o programa Biota Minas*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 389-410.
- Schweizer D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 27:190–193.
- Silva-Dávila D. 2003. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 274: 1–86.
- Solé-Cava AM. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação: In: Matioli R. S., *Biologia Molecular e Evolução*. ed Holos: 172-192.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304–306.
- Togawa, R.C. and Brigido, M.M. 2003. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto.
- Townsend CR, Begon M, Harper JL. 2006. *Fundamentos em Ecologia*. 2 ed, Artmed Editora, Porto Alegre, 592p.
- Zwick MS, Hanson RE, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ, McKnight TD. 1997. A rapid procedure for the isolation of C 0 t-1 DNA from plants. *Genome*, 40(1), 138-142.
- Wheeler WC, et al. 2016. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target- gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*.
- World Spider Catalog. 2017. The world spider catalog, version 15.0. American Museum of Natural History. Available in: < <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Accessed in : 25/08/2017.

### 3. Abrangência

Estado Sigla	Estado	Município
PR	Paraná	3 Barras do Parana
PR	Paraná	4 Barras
PR	Paraná	Alexandra
PR	Paraná	Altonia
PR	Paraná	Ceu Azul
PR	Paraná	Foz do Iguacu
PR	Paraná	Guaira

PR	Paraná	Guarapuava
PR	Paraná	Guaraquecaba
PR	Paraná	Guaratuba
PR	Paraná	Icaraima
PR	Paraná	Londrina
PR	Paraná	Matelândia
PR	Paraná	Matinhos
PR	Paraná	Medianeira
PR	Paraná	Morretes
PR	Paraná	Piraquara
PR	Paraná	Ponta Grossa
PR	Paraná	Prudentópolis
PR	Paraná	Sao Jorge do Patrocinio
PR	Paraná	Sao Miguel do Iguacu
PR	Paraná	Tibagi
PR	Paraná	Turvo
PR	Paraná	Vila Alta

#### 4. Recursos

##### 4.1. Recursos Aprovados pela Fundação Araucária :

Elementos de Despesas	R\$
Diárias	7.200,00
Hospedagem/Alimentação	0 , 00
Material de Consumo	65.640,00
Passagens	0 , 00
Pessoal	0 , 00
Encargos	0 , 00
Bolsas	0 , 00
Outros Serviços de Terceiros	3.200,00
Equipamentos e Material Permanente	57.200,00
<b>Total</b>	<b>133.240,00</b>

Valor total aprovado em Reais: R\$ 133.240,00

Cento e Trinta e Três Mil e Duzentos e Quarenta Reais

##### 4.2. Recursos Solicitados a Outras Fontes, Parcerias e/ou Contrapartida da(s) Instituição(ões) Envolvida(s) :

Entidade	Tipo	Valor	Descrição
----------	------	-------	-----------

#### 5. Equipe

##### 5.1. Membros do Projeto :

Ord	Nome	Instituição	Função
1	Ana Lúcia Dias	UEL	Coordenador(a)

2	Renata da Rosa	UEL	Pesquisador(a) / Executor(a)
3	Lucia Giuliano Caetano	UEL	Pesquisador(a) / Executor(a)
4	Joana Neres da Cruz Baldissera		Pesquisador(a) / Executor(a)
5	Matheus Pires Rincão	UEL	Colaborador(a) / Aluno(a) de Doutorado

## 5.2. Atividades :

**Atividade (A-1):** Determinar o número diploide das espécies analisadas e os sistemas de cromossomos sexuais;

**Início:** 1      **Duração:** 13 Mês(es )

**C. H. S.:** 5 Horas

**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão [Responsável], Lucia Giuliano Caetano

**Atividade (A-2):** Coletar, identificar e depositar em coleção biológica os espécimes coletados.

**Início:** 1      **Duração:** 12 Mês(es )

**C. H. S.:** 3 Horas

**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão, Lucia Giuliano Caetano [Responsável]

**Atividade (A-3):** Desenvolver sondas de sequências de DNA repetitivos para serem utilizadas na hibridização in situ, a fim de compreender a distribuição desses elementos nos cromossomos de aranha;

**Início:** 2      **Duração:** 15 Mês(es )

**C. H. S.:** 2 Horas

**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão, Joana Neres da Cruz Baldissera [Responsável]

**Atividade (A-4):** Definir a composição e distribuição das bandas heterocromáticas, por meio de bandamento C e coloração com CMA3+ e DAPI+;

**Início:** 2      **Duração:** 13 Mês(es )

**C. H. S.:** 3 Horas

**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão [Responsável]

**Atividade (A-5):** Definir um padrão de distribuição espécie-específica das sondas de DNA repetitivo, principalmente dos sítios de DNAr 18S e DNA codificante para histona H3;

**Início:** 3      **Duração:** 15 Mês(es )

**C. H. S.:** 3 Horas

**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão, Joana Neres da Cruz Baldissera [Responsável]

**Atividade (A-6):** Determinar o caminho evolutivo dos cromossomos sexuais, isolando os mesmos e utilizando-os como sondas na hibridização in situ;

- Início:** 7      **Duração:** 11 Mês(es )  
**C. H. S.:** 5 Horas  
**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão [Responsável], Joana Neres da Cruz Baldissera  
**Atividade (A-7):** Caracterizar individualmente as espécies e suas populações com base no gene mitocondrial de citocromo c oxidase subunidade I (COI);
- Início:** 15      **Duração:** 3 Mês(es )  
**C. H. S.:** 10 Horas  
**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão [Responsável], Joana Neres da Cruz Baldissera  
**Atividade (A-8):** Identificar a possível ocorrência de espécies crípticas, e tentar caracterizar, ao menos em parte, seu endemismo ou ocorrência nas demais áreas amostradas;
- Início:** 18      **Duração:** 2 Mês(es )  
**C. H. S.:** 10 Horas  
**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão [Responsável], Renata da Rosa  
**Atividade (A-9):** Identificar possíveis marcadores cromossômicos que ajudem na identificação e diferenciação de espécies da família.
- Início:** 18      **Duração:** 1 Mês(es )  
**C. H. S.:** 10 Horas  
**Membros:** Ana Lúcia Dias, Matheus Pires Rincão, Renata da Rosa [Responsável], Joana Neres da Cruz Baldissera  
**Atividade (A-10):** Análise final dos dados, divulgação e sua aplicação em Programas de Conservação;
- Início:** 19      **Duração:** 6 Mês(es )  
**C. H. S.:** 10 Horas  
**Membros:** Ana Lúcia Dias [Responsável], Matheus Pires Rincão, Renata da Rosa, Joana Neres da Cruz
- 
- 
- 
-

Baldissera 5.3

. Cronograma :

A/M	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
A-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
A-3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
A-4		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
A-5			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
A-6							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
A-7															X	X	X							
A-8																		X	X					
A-9																		X						
A-10																			X	X	X	X	X	X

6. Orçamento Consolidado

Ano 1 - Em Real					
Elementos de Despesa	Trim estres				Total
	1º	2º	3º	4º	
Diárias	7.200,00	0,00	0,00	0,00	7.200,00
Hospedagem/Alimentação	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Material de Consumo	65.640,00	0,00	0,00	0,00	65.640,00
Passagens	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Outros Serviços de Terceiros	3.200,00	0,00	0,00	0,00	3.200,00
- Pessoa Física	3.200,00	0,00	0,00	0,00	3.200,00
- Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Equip. e Material Permanente	57.200,00	0,00	0,00	0,00	57.200,00
Bolsas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pessoal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Encargos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>133.240,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>133.240,00</b>
Ano 2 - Em Real					
Elementos de Despesa	Trim estres				Total
	1º	2º	3º	4º	
Diárias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hospedagem/Alimentação	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Material de Consumo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Passagens	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Outros Serviços de Terceiros	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Física	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Equip. e Material Permanente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bolsas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pessoal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Encargos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ano 1 - Em em Dólar

Elementos de Despesa	Trim estres				Total
	1º	2º	3º	4º	
Diárias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hospedagem/Alimentação	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Material de Consumo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Passagens	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Outros Serviços de Terceiros	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Física	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Equip. e Material Permanente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bolsas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pessoal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Encargos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ano 2 - Em em Dólar

Elementos de Despesa	Trim estres				Total
	1º	2º	3º	4º	
Diárias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hospedagem/Alimentação	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Material de Consumo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Passagens	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Outros Serviços de Terceiros	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Física	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
- Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Equip. e Material Permanente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bolsas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pessoal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Encargos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

7. Diárias

Ord	Localidade	Qtde	Custo Unitário	Custo Total	Mês	Justificativa
1	Brasil - Demais estados - Diversos municípios	1	R\$7.200,00	<b>R\$7.200,00</b>	1	

8. Hospedagem/Alimentação

Ord	Localidade	Qtde	Custo Unitário	Custo Total	Mês
-----	------------	------	----------------	-------------	-----

**9. Materiais de Consumo**

Ord	Especificação	Qtde	Unidade	Custo Unitário	Custo Total	Mês	Justificativa
1	Material laboratorial	1	Vários	R\$65.640,00	R\$65.640,00	1	

**10. Passagens**

Ord	Trecho	Tipo	Qtde	Custo Unitário	Custo Total	Justificativa
-----	--------	------	------	----------------	-------------	---------------

**. Serviços de Terceiros**

**11**

Ord	Especificação	Custo Total	Mês	Justificativa
1	Contratação de mateiro	R\$3.200,00	1	

**12. Materiais Permanentes e Equipamentos**

Ord	Especificação	Qtde	Custo Unitário	Custo Total	Mês	Justificativa
2	Aquisição de material permanente	1	R\$57.200,00	R\$57.200,00	1	

**13. Pessoal**

Ord	Função	Formação Profissional	Perfil Desejado	Custo Total	Mês	Justificativa
-----	--------	-----------------------	-----------------	-------------	-----	---------------

**14. Bolsas**

Modalidade	Ord	Duração	Custo Unitário	Custo Total	Mês	Área de Atuação
------------	-----	---------	----------------	-------------	-----	-----------------

**15. Encargos**

Ord	Especificação	Custo Total	Justificativa
-----	---------------	-------------	---------------

Londrina, 08 de março de 2018



Assinatura do Proponente