

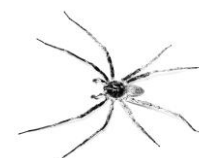


UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MATHEUS PIRES RINCÃO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DE ESPÉCIES DE
CTENIDAE (ARANEAE):
A IMPORTÂNCIA DO DNA REPETITIVO NA DIVERSIFICAÇÃO
CARIOTÍPICA DA FAMÍLIA**

Londrina
2020

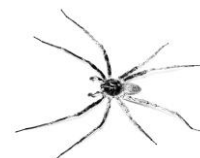


MATHEUS PIRES RINCÃO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DE ESPÉCIES DE
CTENIDAE (ARANEAE):
A IMPORTÂNCIA DO DNA REPETITIVO NA DIVERSIFICAÇÃO
CARIOTÍPICA DA FAMÍLIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor.
Orientadora: Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina
2020



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R582 Rinção, Matheus Pires .
Caracterização citogenômica de espécies de Ctenidae (Araneae) : a importância do DNA repetitivo na diversificação cariotípica da família / Matheus Pires Rinção. - Londrina, 2020.
96 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Heterocromatina - Tese. 2. Aranha - Tese. I. Dias, Ana Lúcia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

MATHEUS PIRES RINCÃO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DE ESPÉCIES DE CTENIDAE
(ARANEAE):
A IMPORTÂNCIA DO DNA REPETITIVO NA DIVERSIFICAÇÃO
CARIOTÍPICADA FAMÍLIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

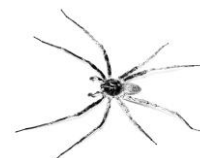
Dra. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dr. Douglas de Araujo
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul –
UFMS

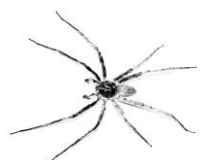
Dra. Marielle Cristina Schneider
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT

Londrina, 17 de fevereiro de 2020



“A grandeza vem não quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque, apenas se você esteve nos mais profundos vales é que poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha.”

Richard M. Nixon



Agradecimentos

Os últimos anos foram marcados por uma intensa jornada de aprendizado e autoconhecimento, na qual encontrei e convivi com muitas pessoas. E, posso dizer com convicção que muito dessa convivência teve papel importante, não apenas no que está sendo apresentado neste estudo, mas no profissional que venho me tornando. Então deixo estes agradecimentos especiais a algumas dessas pessoas, cujas participações foram marcantes nesse percurso.

Primeiramente eu agradeço à Universidade Estadual de Londrina- UEL, pelos 10 anos ininterruptos de experiências e conhecimentos que tive. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, no qual cursei também meu mestrado, que na figura dos seus professores tanto me ensinou, e tanto contribuiu para que eu pudesse tirar o maior proveito possível, dessa experiência de vida engrandecedora que foi o doutorado.

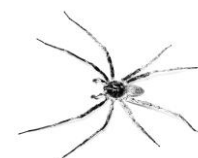
Agradeço à Capes, por ter me concedido a bolsa de estudos, sem a qual dificilmente eu teria conseguido me dedicar tanto ao doutorado. E um agradecimento especial às Fundações Araucária e Grupo Boticário, que através do programa Biodiversidade do Paraná fomentaram a maior parte do trabalho executado até o momento por nossa equipe, bem como todo o trabalho que ainda está vir dentro do nosso projeto.

Agradeço ao Robson Rockembacher, técnico, que me acompanhou na maior parte das minhas viagens de campo, por muitas noites de coleta no meio de muitas florestas do estado do Paraná.

Agradeço ao Rafael Campos de Barros, pela oportunidade concedida a mim de acompanhar as atividades do Laboratório de Entomologia Sistemática da UEL, possibilitando minhas primeiras coletas no Parque Nacional do Iguaçu, e por todo apoio, amizade, e todo conhecimento compartilhado durante tantos anos.

Agradeço ao Laboratório de Citogenética Animal da UEL, o LACA, por ter me acolhido, me ensinado tanto durante estes mais de 9 anos trabalhando juntos: o Dr. Fábio H. Takagui, por seu eterno entusiasmo na citogenética; às Dras. Angélica Rossotti dos Santos e Mariana Campaner Usso por terem me ensinado e acompanhado por muitos anos no laboratório; à Me. Raquel B. Gallo, pela convivência e aprendizado durante alguns anos no LACA; agradeço também às Mes. Jaqueline F. Dionísio e Ana Beatriz G. F. Monteiro, por anos de convivência e aprendizado mútuo dentro do LACA, pela companhia dia-a-dia no laboratório; ao Luis R. S. Pompeo também por seu companheirismo e descontração no laboratório nos últimos anos.

Faço aqui um agradecimento especial à Dra Juceli Gonzalez Gouveia, que muito me ensinou dentro da citogenética, principalmente por meio das muitas discussões sobre técnicas e metodologias, que tanto me ajudaram. E a Dra. Joana Aparecida Baldissera, também pelas discussões teóricas em muitas tardes no laboratório, que muito me ensinaram.



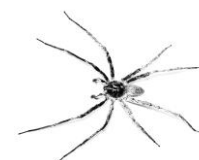
Deixo um agradecimento aos professores do programa, em especial ao Dr. André Luis Laforga Vanzela, Dra. Silvia Helena Sofia e Dra. Fernanda Simões de Almeida por todo conhecimento passado, e por toda disponibilidade em me receber sempre que precisei.

Agradeço à Dra. Renata da Rosa, por todo apoio dentro do LACA, e por todo conhecimento passado sobre citogenética. E à Dra. Lucia Giuliano Caetano, por seu conhecimento, seu carisma, seu entusiasmo em fazer coletas, que me permitiu inclusive coletar na Base de Estudos do Pantanal – UFMS, e por todo apoio dado ao nosso projeto de estudo das aranhas.

Faço um agradecimento de coração à Profa. Dra. Ana Lúcia Dias, minha orientadora, por todo ensinamento, paciência, motivação e apoio. Agradeço por ter aceitado o desafio de me orientar com as aranhas, por me apoiar sempre que eu propunha uma nova abordagem ou um novo local de coleta; agradeço por toda orientação e por toda liberdade que eu tive para trabalhar nesses 6 anos de citogenética de aranhas. Agradeço a amizade, a qual sempre me recordarei. Muito do meu caráter como profissional, da maneira como me portarei como cientista e como professor e da minha ética de trabalho, foram aprendidos com você, que sempre estará marcada na minha história.

Agradeço à minha namorada, Talita S. Menoia, por estar do meu lado e ter me apoiado nesses 7 anos que estamos juntos, mesmo quando eu tinha que passar sábados, domingos e feriados, manhãs, tardes e noites dentro do laboratório.

E agradeço muito à minha família, sem a qual eu não teria chego onde cheguei. À minha mãe Clair de Fátima Pires Rincão, professora, guerreira, exemplo de vida para mim, ao meu pai Vilson Crispo Rincão, motorista, por seus sacrifícios para que tivéssemos acesso às oportunidades, aos dois por todo apoio, carinho e conselhos. E aos meus irmãos, Dra. Michelle Pires Rincão, e Dr. Vinicius Pires Rincão, biólogos como eu, mais velhos, exemplos de sucesso que sempre me motivaram a dar o melhor de mim.

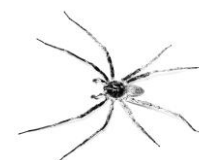


Rincão, Matheus Pires **Caracterização citogenômica de espécies de Ctenidae (Araneae): a importância do DNA repetitivo na diversificação cariotípica da família.** 2020. 96 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

RESUMO

Aranhas são um dos mais diversos grupos de animais do planeta, presentes em praticamente todos os continentes, exceto na Antártida. Contudo, citogeneticamente ainda existe uma grande lacuna dentro de Araneae, pois menos de 2% de todas as aranhas foram estudadas do ponto de vista cromossômico, somando um total de 867 espécies, em 74 das 120 famílias da Ordem. Uma dessas famílias é Ctenidae, composta por algumas das maiores aranhas do mundo, com 519 espécies e 48 gêneros presentes em todas as florestas tropicais. Apesar de serem amplamente conhecidas, com espécies de interesse médico, dentro de Ctenidae apenas 11 espécies tiveram seus cariótipos publicados. Reconhecendo a necessidade de se ampliar os estudos citogenéticos nessa família, não apenas em número de espécies, mas também em número de marcadores cromossômicos, o presente estudo teve como objetivo analisar citogeneticamente 10 espécies distribuídas em quatro gêneros diferentes dentro de Ctenidae, sendo eles *Ancylometes*, *Ctenus*, *Guasuctenus* e *Isoctenus*. Para isso foram utilizadas coloração com Giemsa, CMA₃ e DAPI, bandeamento C, e a FISH com sondas de DNAr 18S e histona H3. Todas as espécies analisadas apresentaram $2n♂=28$ ($26+X_1X_20$), com exceção de *Ancylometes concolor*, com $2n♂=26$ ($24+X_1X_20$), o primeiro relato desse número diploide na família. A morfologia cromossômica também se mostrou conservada, predominantemente composta por cromossomos acrocêntricos/telocêntricos, entretanto, três espécies, *Isoctenus janeirus*, *I. ordinario* e *I. strandi*, apresentaram cromossomos subtelocêntricos, o que sugere a ocorrência de inversões pericêntricas durante a evolução desses cariótipos, uma vez que apenas a morfologia dos cromossomos se alteram, e não o número diploide da espécie. Em relação ao DNAr 18S, sete das nove espécies hibridizadas apresentaram apenas um par autossômico como portador dessa sequência, somente *G. longipes* e *I. ordinario* apresentaram dois pares portadores o que sugere, devido a posição basal dessas duas espécies na filogenia do clado que abriga *Isoctenus*, que este seja um padrão ancestral para o gênero. Além disso, o presente estudo trouxe os primeiros dados de FISH com sondas de histona H3 em aranhas, hibridizadas em 9 das 10 espécies aqui analisadas, evidenciando esta sequência como um potencial marcador cromossômico para este grupo de animais.

Palavras-chaves: Citogenética de Aranhas. DNAr 18S. Heterocromatina. FISH. Histona H3.

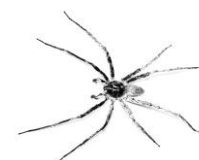


Rincão, Matheus Pires **Cytogenomic characterization of Ctenidae (Araneae) species: the importance of repetitive DNA in family karyotypic diversification.** 2020. 96 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) - Londrina State University, Londrina, PR.

ABSTRACT

Spiders are one of the most diverse groups of animals on the planet, present in virtually every continent except Antarctica. However, cytogenetically there is still a large gap within Araneae, less than 2% of all spiders have been studied cytogenetically, totaling 867 species, in 74 of the 120 families of the order. One of these families is Ctenidae, composed of some of the largest spiders in the world, has species distributed throughout the rainforests, and comprises 519 species in 48 genera. Despite being widely known, with species of medical interest, within Ctenidae only 11 species had their karyotypes published. Recognizing the need to expand cytogenetic studies in this family, not only in number of species, but also in number of chromosomal markers, this study aimed to cytogenetically analyze 10 species distributed in 4 different genera within Ctenidae, being *Ancylometes*, *Ctenus*, *Guasuctenus* and *Isoctenus*. For this were used, staining with Giemsa, CMA3 and DAPI, C-banding, as well as FISH with 18S rDNA and histone H3 probes. All species analyzed presented $2n♂ = 28$ ($26 + X_1X_20$), except for *Ancylometes concolor*, with $2n♂ = 26$ ($24 + X_1X_20$), the first report of this diploid number in the family. The chromosomal morphology was also conserved, predominantly composed by acrocentric/telocentric chromosomes. However, three species, *I. janeirus*, *I. ordinario* and *I. strandi*, exhibited subtelocentric chromosomes, suggesting the occurrence of pericentric inversions during the evolution of these karyotypes, since only the morphology of the chromosomes changes, not the diploid number of the species. Regarding the 18S rDNA, seven of the nine hybridized species presented only one autosomal pair as the sequence carrier, only *G. longipes* and *I. ordinary* presented two carrier pairs, which, due to the basal position of these two species in the phylogeny, of the clade that houses the *Isoctenus*, suggests that this is an ancestral pattern for the genus. Furthermore, the present study brought the first FISH data with histone H3 probes in spiders, hybridized in 9 of the 10 species analyzed here, highlighting this sequence as a potential chromosomal marker for this group of animals.

Keywords: FISH. 18S rDNA. Heterochromatin. Histone H3. Spider Cytogenetics.



LISTA DE TABELAS

Fundamentação Teórica

- Tabela 1** – Dados citogenéticos em espécies da família Ctenidae, retirada de Rincão et al. (2017) 26
- Table 2** – Espécies coletadas, distribuídas por sexo e local de coleta. PARNA = Parque Nacional 29

Capítulo 1

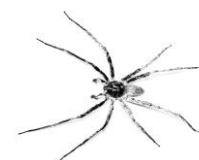
- Table 1** – Species analyzed and collection sites. PNS = Parque Nacional de Superagui; PEMG = Parque Estadual Mata dos Godoy 43
- Additional File 1: Table S1** - Specimens separated by collection sites. PNS = Parque Nacional de Superagui; PEMG = Parque Estadual Mata dos Godoy. The numbers determine specimen voucher deposited in the arachnological collection of the Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curator AD Brescovit), São Paulo/SP, Brazil..... 60

Capítulo 2

- Tabela 1** – Lista de espécies analisadas, distribuídas por sexo e locais de coleta. PARNA = Parque Nacional..... 65

Capítulo 3

- Tabela 1** – Espécies com dados citogenéticos em Ctenidae, atualizada a partir de Rincão et al. (2017). AgRON = Regiões Organizadoras de Nucléolo detectadas por impregnação com nitrato de prata. FISH = *Fluorescence in situ Hybridization*. T = Terminal. I = Intersticial 82
- Tabela 2** – Relação de indivíduos de *Ancylometes concolor* analisados, distribuídos por sexo e locais de coleta. PARNA = Parque Nacional. UFMS = Universidade Federal do Mato Grosso do Sul..... 84



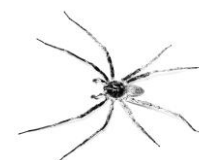
LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fundamentação Teórica

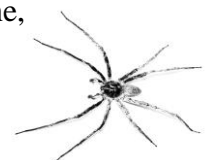
- Figura 1** – Esquema da morfologia externa de uma aranha. Imagem retirada Foelix (2011)..... 19
- Figura 2** – Esquema da anatomia interna de uma aranha, montado a partir das imagens de Foelix (2011). 19
- Figura 3** – Esquema do padrão de olhos observado em Ctenidae..... 23
- Figura 4** – Mapa mostrando os oito locais de coleta amostrados no presente estudo, distribuídos entre os estados do Paraná, em destaque, e do Mato Grosso do Sul..... 31
- Figura 5** – Imagens das espécies analisadas no presente trabalho. **a** *Ancylometes concolor*, **b** *Ctenus ornatus*, **c** *C. medius*, **d** *C. longipes*, **e** *Isoctenus janeirus*, **f** *I. ordinário*, **g** *I. cf coxalis* (imagem de Pedro H. Martins)..... 32

Capítulo 1

- Fig. 1** – Male and female karyotypes of *Guasuctenus longipes* with conventional staining Giemsa (**a**, **b**, respectively); male karyotype after C banding (**c**), arrow points to the terminal heterochromatic blocks on the long arm of pair 4. Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and Histone H3 (red). 45
- Fig. 2** – Male and female karyotypes of *Ctenus medius* with conventional staining Giemsa (**a**, **b**, respectively); male karyotype after C banding (**c**) arrowhead points the terminal heterochromatic block on the long arm of one chromosome of the pair 13; two bivalents in pachytene after C-banding, arrows show interstitial heterochromatin in one of them (**d**). Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and Histone H3 (red)..... 47
- Fig. 3** – Diakinesis cell of *Ctenus medius* after C-banding (**a**), arrowheads show sex chromosomes and arrow show an autosomal bivalent which, in association with the X₂ sex chromosome forms the trivalent; graphical representation of trivalent formation in diakinesis, showing pairing in the



	region of short arm between the autosomal bivalent and the X ₂ sex chromosome, suggesting a possible translocation (b).....	48
Fig. 4 –	Male and female karyotypes of <i>Ctenus ornatus</i> with conventional staining Giemsa (a, b, respectively); male karyotype after C-banding (c) and staining with fluorochrome CMA ₃ (d), inset boxes show the sex chromosome pair of the PEMG (c1, d1) and PNS (c2, d2): note the difference in X ₁ sex chromosome banding pattern between populations. Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and Histone H3 (red).....	49
Fig. 5 –	Meiotic cells after staining with base-specific fluorochromes DAPI (a, c, e, g) and CMA3 (b, d, f, h). Arrowheads point sex chromosomes. Diplotene cells of <i>Guasuctenus longipes</i> (a, b); Diakinesis cells of <i>C. medius</i> (c, d); Pachytene cells (e, f) and diplotene cells (g, h) of <i>C. ornatus</i> : arrows (h) point to interstitials blocks.	50
Fig. 6 –	Representative idiogram of <i>Guasuctenus longipes</i> , <i>Ctenus medius</i> e <i>C. ornatus</i> showing different banding: C-banding, 18S DNAr and histone H3 sites and regions where the heterochromatin blocks are coincident with the 18 rDNA or histone H3 sites.	51
Additional File 2: Fig. S1 -	Female (a) and male (b-h) meiotic cells of <i>G. longipes</i> with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diplotene (c); diakinesis (d); metaphase II (e); anaphase II (f); diplotene (g, h); arrows show associated satellites between homologous (g) and non-homologous chromosomes (h) in all individuals of the PNS population coinciding with 18S rDNA sites (boxes).	58
Additional File 3: Fig. S2 -	Female (a) and male (b-h) meiotic cells of <i>C. medius</i> with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diakinesis cell (c); metaphase I cell (d); metaphases II cells, with 15 and 13 chromosomes (e, f, respectively); diakinesis (g) and pachytene cells (h), showing the trivalent observed in the individual of PEMG.....	58
Additional File 4: Fig. S3 -	Female (a) and male (b-h) meiotic cells of <i>C. ornatus</i> with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diakinesis cell (c); metaphases II cells; pachytene,	



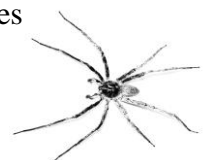
diakinesis and metaphases II cells (**e, f, g**, respectively, showing one supernumerary chromosome (**S**), totally heteropicnotic (**e**); diakinesis cell evidencing two supernumerary chromosomes (**S₁** and **S₂**) with similar behavior to sex chromosomes. 59

Capítulo 2

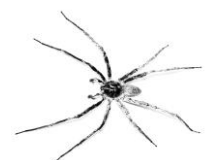
- Figura 1** – Cariótipos de metáfases mitóticas de *Isoctenus*. **a** *I. corymbus* (♀). **b** *I. coxalis* (♂ e ♀). **c** *I. herteli* (♂ e ♀). **d** *I. janeirus* (♂ e ♀). **e** *I. ordinario* (♂ e ♀). **f** *I. strandi* (♂ e ♀). Barra de escala = 10 µm. 68
- Figura 2** – Células meióticas de machos de *Isoctenus*. **a – c** *I. corymbus*. **d – g** *I. coxalis*. **h – j** *I. herteli*. **k – n** *I. janeirus*. **o – r** *I. strandi*. **a, e, h, l, p, t** paquítenos. **b, f, i, m, q** diplótenos e **u** metáfase I. **c, g, j, n, r, v** células em metáfase II. As cabeças de seta mostram os cromossomos sexuais. Barra de escala = 10 µm. 69
- Figura 3** – Células mitóticas e meióticas de *Isoctenus* submetidas ao bandeamento C. **a** metáfase mitótica de *I. coxalis*. **b** diplóteno de *I. herteli*. **c** metáfase mitótica de *I. janeirus*. **d** diplóteno de *I. ordinario*. As setas em **b, d** mostram os cromossomos sexuais. Barra de escala = 10 µm. 70
- Figura 4** – Células mitóticas e meióticas de *Isoctenus* submetidas à FISH. As setas apontam os cromossomos sexuais nas células em meiose. **a** *I. coxalis*. **b-c** *I. herteli*. **d** diacinese de *I. janeirus*. **e** diplóteno e **f** metáfases II de *I. strandi*. **g** diacinese de *I. ordinario*. Barra de escala = 10 µm. 71
- Figura 5** – Cladograma das espécies de *Isoctenus*, modificado a partir de Polotow e Brescovit (2009), mostrando 2n das espécies analisadas no presente estudo e o número de pares cromossômicos portadores de DNAr 18S e Histona H3. 1P = um par cromossômico portador da sequência; 2P = dois pares cromossômicos portadores da sequência. 73

Capítulo 3

- Figura 1** – Células meióticas de *Ancylometes concolor*. **a, b** paquítenos de fêmea e macho, respectivamente, evidenciando comportamento de heteropicnose positiva dos sexuais em machos (seta). **c – h** células de macho. **c, e d** diplótenos, **e** diacinese, **f** metáfase I, mostrando comportamento de associação em paralelo dos cromossomos sexuais (setas). **g – h** metáfases

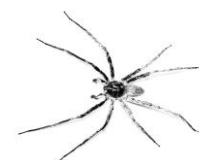


- II, mostrando células com 12 e 14 cromossomos respectivamente. Barra de escala = 10 μm 85
- Figura 2** – Cariótipos de metáfases mitóticas de *Ancylometes concolor*. **a** cariótipo de macho. **b** cariótipo de fêmea. **c** cariótipo de banda C corado com iodeto. **d** cariótipo com fluorocromo CMA₃. **e** cariótipo de FISH com sonda de DNAr 18S, evidenciando o par 6 como portador dos sítios. Barra de escala = 10 μm 86
- Figura 3** – Células meióticas de machos de *Ancylometes concolor* submetidas à FISH. **a** diplóteno, evidenciando um bivalente marcado com sonda de DNAr 18S, em verde. **b** diplóteno, evidenciando dois bivalentes marcados com sonda de histona H3. Barra de escala = 10 μm 87
- Figura 4** – Cariótipo de *Ancylometes concolor* (σ) de células em paquíteno submetido ao bandejamento C e ideograma representando os blocos heterocromáticos em cada bivalente. 88



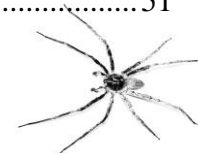
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolo.
AgRONs	Regiões Organizadoras de Nucléolo detectadas com impregnação com nitrato de prata.
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization.</i>
CMA ₃	Cromomicina A3
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenilindole
SCS	Sistema Cromossômico Sexual
PNS	Parque Nacional do Superagui
PARNA	Parque Nacional
PEMG	Parque Estadual Mata dos Godoy

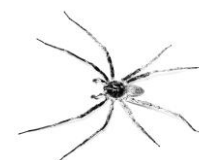


SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS ARANHAS	18
2.2	A SISTEMÁTICA DE ARANEAE	19
2.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS DE CTENIDAE	20
2.4	CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS SOBRE CTENIDAE	22
2.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE A CITOGENÉTICA DE ARANHAS.....	24
2.6.1	Uma Breve Visão Sobre Os Sistemas Cromossômicos Sexuais Em Aranhas	25
2.6	CONSIDERAÇÕES SOBRE A CITOGENÉTICA DE CTENIDAE	26
3	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO	29
4	MATERIAL E LOCAIS DE COLETA	29
5	REFERÊNCIAS	33
6	CAPÍTULO 1	39
	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	40
6.1	INTRODUCTION	42
6.2	MATERIAL AND METHODS	43
6.2.1	Sample Collection.....	43
6.2.2	Cytogenetic Analyses	44
6.2.3	Fluorescence In Situ Hybridization (Fish).....	44
6.3	RESULTS	45
6.3.1	Guasuctenus Longipes	45
6.3.2	Ctenus Medius	46
6.3.3	Ctenus Ornatus.....	48
6.4	DISCUSSION	51
6.4.1	Karyotypic Analysis	51



6.4.2	Inferences About The Distribution Of Repetitive Dna In Cteninae	53
6.5	REFERENCES	55
6.6	ANEXOS	58
7	CAPÍTULO 2	61
	Caracterização Cromossômica Comparativa De Seis Espécies De Isoctenus Bertkau, 1880 (Araneae:Ctenidae)	62
7.1	INTRODUÇÃO	63
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	64
7.3	RESULTADOS	67
7.4	DISCUSSÃO	71
7.4.1	Número Diploide, Estrutura Cariotípica, E Scs Em Isoctenus	71
7.4.2	Sítios De Dna Repetitivo	74
7.5	REFERÊNCIAS.....	76
8	CAPÍTULO 3	79
	Primeira Descrição Citogenética Para Ancylozetes (Araneae, Ctenidae): Mapeamento Da Heterocromatina Constitutiva E Dna Repetitivo Em Ancylozetes Concolor (Perty, 1833)	80
8.1	INTRODUÇÃO	81
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	83
8.3	RESULTADOS	85
8.3.1	Caracterização Citogenética De Ancylozetes Concolor.....	85
8.3.2	Mapeamento Dos Blocos De Heterocromatina Constitutiva.....	87
8.4	DISCUSSÃO	88
8.4.1	Número Diploide E Citotaxonomia	88
8.4.2	Mapeamento De Dna Repetitivo E Heterocromatina	90
8.5	CONCLUSÃO	92
8.6	REFERÊNCIAS.....	93
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96



1. Introdução

As aranhas são animais ecologicamente muito importantes, não apenas por serem, muitas vezes, predadores de topo de cadeia, mas também por ocuparem quase todos os nichos possíveis, tal como ilhas no ártico, dunas nos desertos, o interior de cavernas, lagos e grandes altitudes, como no pico das montanhas, utilizando até mesmo o vento como meio de dispersão, em um fenômeno chamada de balonismo (FOELIX, 2011). Araneae é uma das mais diversas ordens de animais e, com algumas exceções, são exclusivamente peçonhentas, com algumas poucas espécies possuindo venenos ativos em humanos, como é o caso das famosas “aranha marrom”, do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe, 1832 (MALAQUE et al., 2016), e “aranha armadeira”, do gênero *Phoneutria* Perty, 1833 (FOELIX, 2011). As aranhas possuem também grande variação em morfologia, tamanho e preferências alimentares, além de apresentarem comportamentos complexos de caça e reprodução (FOELIX, 2011). Seu papel ecológico e sua interação com o ser humano ressaltam a importância em estudar estes organismos.

Nos últimos vinte anos, mais de 13.000 novas espécies de aranhas foram identificadas e descritas morfologicamente (PLATNICK, 2001; WORLD SPIDER CATALOG, 2020), contudo, há muito por se conhecer sobre este grupo, considerando que muitos dos ecossistemas tropicais que possuem um alto índice de endemismo, ainda não foram completamente estudados. Por este motivo, há diversas lacunas no conhecimento tanto taxonômico quanto biogeográfico e principalmente genético a cerca desses animais. Essas lacunas dificultam estabelecer relações evolutivas mais concisas entre as espécies, de modo que análises integradas que combinem ou se relacionem com diversas linhas de conhecimento, representam o melhor caminho para estabelecer hipóteses mais seguras sobre os eventos evolutivos que atuaram na diversificação do grupo (FUNK; OMLAND, 2003; NYLANDER et al., 2004).

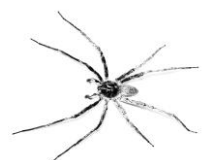
No início de 1990, Coddington e Levi (1991) estimaram que apenas 20% de todas as espécies da ordem Araneae teriam sido descritas até aquele momento, evidenciando que a maior parte das espécies de aranhas ainda não haviam sido descritas, o que permanece verdadeiro nos dias atuais, visto que o número de novas espécies descritas anualmente continua alto (WORLD SPIDER CATALOG, 2020) Com espécies, em sua maioria, restritas aos ambientes florestais, as aranhas da família Ctenidae são potenciais modelos para estudos biogeográficos (HAZZI et al., 2018) e de mecanismos evolutivos, uma vez que estes



ambientes estão extremamente degradados e fragmentados no Brasil, ainda mais no que se refere à Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009; SCARANO; CEOTTO, 2015). Nesta família estão inseridas algumas das maiores aranhas do mundo, como é o caso dos gêneros *Ancylometes* Bertkau, 1880 e *Phoneutria* Perty, 1833 (Höfer e Brescovit, 2000), restritos à região neotropical, que compreende o sul do México até a região da Patagônia.

Além da grande diversidade morfológica e comportamental observada nas aranhas, a citogenética também tem evidenciado esses animais como um importante modelo de estudo. As análises cromossômicas em aranhas iniciaram a 135 anos com Carnoy, em 1885 (ARAUJO et al., 2012) e, desde essa época, muitas famílias de aranhas foram analisadas; ainda assim, uma quantidade muito pequena de espécies foi cariotipada, menos de 2% das mais de 48 mil espécies descritas taxonomicamente (ARAUJO et al., 2020; WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Apesar disso, muito se avançou no conhecimento citogenético deste grupo animal, principalmente na compreensão do surgimento dos sistemas cromossômicos sexuais (SCS) (KRÁL et al., 2006, 2007; ARAUJO et al., 2012; KOŘÍNKOVA; KRÁL, 2013), os quais vem ganhando destaque nos estudos de citogenética, pois tem origens independentes em diversas famílias e gêneros, e a conversão de um sistema em outro é um evento recorrente dentro de Araneae (ARAUJO et al., 2012).

Apesar de sua importância tanto ecológica quanto socioeconômica, Ctenidae reflete o escasso conhecimento de informações citogenéticas em aranhas, com estudos em apenas 11 espécies (ARAUJO et al. 2020), das 519 espécies da família (WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Assim, este trabalho teve o intuito de descrever o uso de marcadores cromossômicos, convencionais e moleculares, para o estudo da estrutura e diversificação cariotípica dentro da família, além de ampliar o número de espécies com dados citogenéticos.



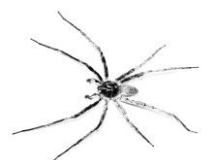
2. Fundamentação Teórica

2.1 – Características gerais sobre os aspectos morfológicos das aranhas

As aranhas são um grupo de animais que pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Araneae, correspondendo atualmente à segunda maior ordem dessa classe, perdendo em número de espécies apenas para Acari. Duas sinapomorfias corroboram o monofiletismo de Araneae, diferenciando-a das demais ordens dentro de Arachnida, sendo: a presença de fiandeiras, situadas na porção final do corpo, que servem para produção da seda; e palpos modificados em órgãos copulatórios, talvez a principal característica desse grupo de animais (WHEELER et al., 2016).

O corpo das aranhas é composto por dois segmentos, o prossoma ou cefalotórax, e o opistossoma ou abdômen, sendo os dois segmentos unidos por uma estrutura em forma de cilindro, denominada de pedicelo (**Fig. 1**) (FOELIX, 2011). O prossoma é recoberto por duas placas, uma dorsal chamada de carapaça e uma ventral chamada de esterno; neste segmento estão situadas as quelíceras, os pedípalpos, quatro pares de apêndices locomotores (as pernas), os olhos, a boca, o estômago e sistema nervoso central, de modo que retém como função a captura de alimentos, a locomoção e a integração sensorial ou nervosa (**Figs. 1 e 2**). Já o opistossoma tem um formato de saco e é responsável pelas funções mais vegetativas do organismo, como digestão, excreção, circulação, reprodução e a produção de todos os tipos de seda, abrigando o intestino, o coração, as gônadas, o epígeno, os pulmões e as glândulas de seda (**Figs. 1 e 2**) (FOELIX, 2011).

Embora as aranhas não tenham uma cabeça definida, a região dorsal da carapaça tem um sulco torácico (**Fig.1**), que delimita a região anterior que representa a cabeça, e a porção posterior, torácica. Internamente uma cutícula se estende do sulco torácico e serve de ancoragem para os músculos dorsais do estômago de sucção (FOELIX, 2011). A porção da cabeça abriga os olhos das aranhas, geralmente em número de oito. Contudo, algumas famílias de aranhas podem apresentar espécies com alguns padrões diferenciados: como é o caso das aranhas cavernícolas *Sinopoda guap*, *S. soong* e *S. scurion* descritas por Jäger 2012, da família Sparassidae, que apresentam ausência total dos olhos; espécies com apenas dois olhos, como é o caso de *Nops agnarssoni* Sánchez-Ruiz et al., 2015, Caponiidae; quatro olhos, como na família Tetrablemidae, em *Tetrablemma kepense* Lin et al. 2018; e com seis olhos, como observado em *Harpactea hombergu* (SCOPOLI, 1763), Dysderidae (MURPHY; ROBERTS, 2015).



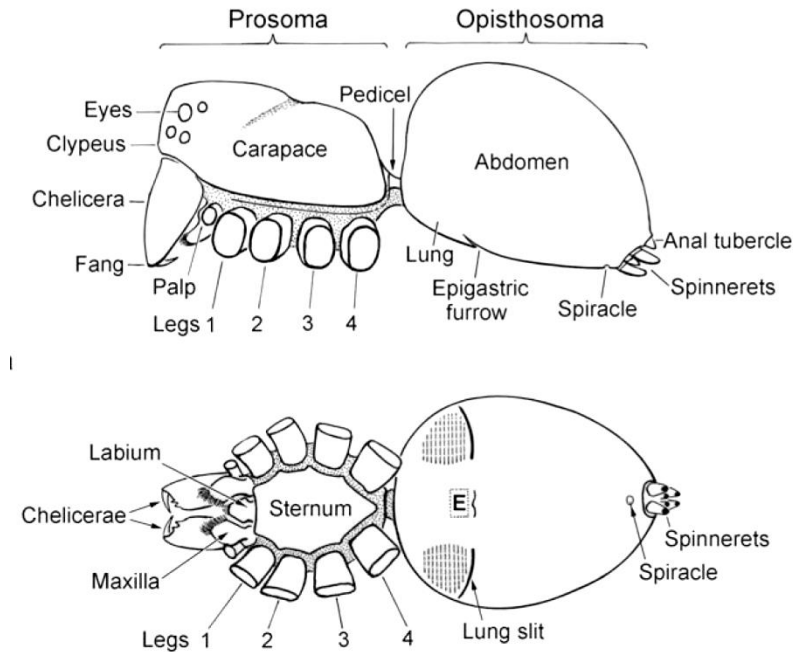


Figura 1. Esquema da morfologia externa de uma aranha. Imagem retirada Foelix (2011).

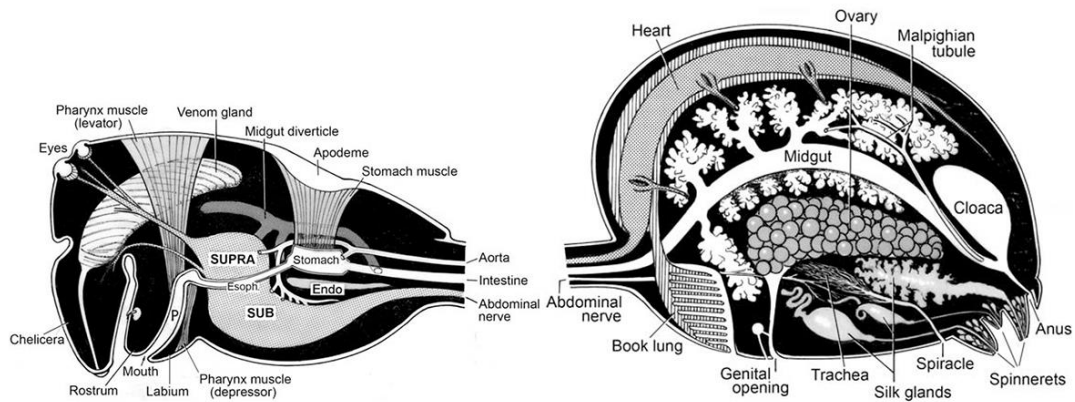
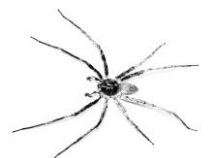


Figura 2. Esquema da anatomia interna de uma aranha, montado a partir das imagens de Foelix (2011).

2.2 – A sistemática de Araneae

Atualmente, a ordem Araneae é composta por mais de 48 mil espécies, distribuídas em 120 famílias e 4.153 gêneros (WORLD SPIDER CATALOG, 2020). A ordem se divide em duas subordens, Mesothelae que abriga as aranhas com as características ancestrais, como presença das fiandeiras dispostas na posição ventral mediana no opistossoma. Esta subordem abrange apenas uma família, Liphistiidae. Já Opisthothelae, caracterizada pela presença das fiandeiras dispostas ventralmente na porção distal do abdômen (FOELIX, 2011; WHEELER



et al., 2016). Opisthothelae se ramifica em duas infraordens: Mygalomorphae, representada pelas caranguejeiras, aranhas cujos caracteres morfológicos mais marcantes são as quelíceras ortognatas, isto é, disposição paralela das quelíceras; e Araneomorphae que, além de apresentar quelíceras labdognatas, ou seja, dispostas de maneira oposta uma à outra, também apresenta como sinapomorfia glândulas piriformes de produção de seda; estas são responsáveis por produzir uma seda com propriedades adesivas, o que permite a esses animais tanto fixar a seda em determinadas superfícies quanto um fio em outro, produzindo teias mais complexas e com mais facilidade (FOELIX, 2011; WHEELER et al., 2016).

Em Araneomorphae, as relações filogenéticas entre as famílias não estão bem resolvidas. Genericamente a infraordem pode ser dividida em Entelegynae e Haplogynae, de acordo com a complexidade das estruturas reprodutivas (FOELIX, 2011), embora as aranhas haploginas não representem um grupo monofilético (WHEELER et al., 2016; FERNÁNDEZ et al., 2018). Em Entelegynae estão agrupadas aquelas aranhas que possuem características derivadas morfológicamente, representando mais de 80% de todas as espécies descritas atualmente, sendo composta por diversos clados e superfamílias, dentre eles o clado composto pelas aranhas com calamistro ovalado, que trata-se de uma fileira de cerdas serrilhadas, situada no metatarso e que tem como função pentear os fios de seda (FOELIX et al. 2011; WHEELER et al., 2016). Neste mesmo clado está inserida Lycosoidea, superfamília que abriga Ctenidae, onde estão situadas as espécies de interesse do presente estudo.

2.3 – Aspectos biológicos de Ctenidae

Ctenidae é uma família de aranhas mais comum e abundante em florestas tropicais (BRESOVIT et al., 2011; CHAVARI et al., 2014; RAIZER et al., 2017), que exceto por alguns gêneros, como *Acanthoctenus* Keyserling, 1877 e *Viracucha* Lehtinen, 1967 (GRISWOLD et al., 2005), é composta principalmente por espécies não cribeladas. O cribelo é uma estrutura em forma de placa, que também auxilia na produção da seda, e em algumas espécies é composto por até 40 mil fúsculas, que são canalículos por onde a seda é secretada, inclusive nas fiandeiras; é uma estrutura ancestral, perdida nos clados mais derivados (FOELIX, 2011).

As aranhas dentro de Ctenidae são de médio a grande porte, variando de 4 a 40 mm de comprimento total do corpo (POLOTOW et al., 2014), medindo até mais de 20 cm se considerarmos a extensão total das pernas, como observado nos gêneros *Ancylometes*, *Phoneutria* e *Californctenus* (JIMÉNEZ et al., 2017). São aranhas cursoriais, que geralmente



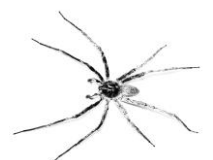
não fazem uso da teia para capturar suas presas, são rápidas, de hábitos noturnos e geralmente habitam o solo de ambientes florestais (POLOTOW; BRESCOVIT, 2014), embora algumas espécies tenham hábitos arborícolas, como é o caso de *Enoploctenus* Simon, 1897 (DIAS et al., 2010), ou até mesmo cavernícolas, como as espécies do gênero *Ciba*, descritas por Bloom et al. (2014).

Os ctenídeos são em essência predadores que, embora provavelmente tenham os insetos como sua principal fonte de alimento, possuem um cardápio variado que pode abranger desde outras aranhas, incluindo canibalismo, até pequenos vertebrados como peixes, anuros e répteis (WILLEMART; KANETO, 2004; MOURA; AZEVEDO, 2011; DEACON et al., 2015; FOLLY et al., 2017; FOLT; LAPINSKI, 2017). Popularmente, Ctenidae é mais conhecida pelo fato de abrigar espécies do gênero *Phoneutria*, conhecidas como “armadeiras”, as quais possuem peçonha de importância médica.

Desde 2007, quando o Ministério da Saúde começou a monitorar os casos de araneísmo no Brasil, são registrados mais de 100 mil acidentes com picadas de aranhas no país. Somente no ano de 2017, o último ano cujas estatísticas foram liberadas, ocorreu mais de 220 mil acidentes com aranhas, com pelo menos 30 mortes, envolvendo as cinco regiões do país. Desses mais de 200 mil acidentes, a identificação das espécies ocorreu em menos de 5% dos casos sendo que, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), as aranhas armadeiras aparecem como a segunda maior causa de araneísmo no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Além do comportamento agressivo e dos hábitos antrópicos, a composição do da peçonha, ativo em seres humanos, faz das espécies de *Phoneutria* uma das poucas espécies relevantes para a saúde humana. *Phoneutria nigriventer* é uma das espécies do gênero mais bem estudadas, seu veneno tem uma composição complexa, atuando como uma neurotoxina, afetando canais iônicos (sódio, potássio e cálcio) e receptores do sistema neuromuscular de vertebrados e invertebrados (DINIZ et al., 2018).

Valenzuela-Rojas et al. (2019) avaliando o efeito do veneno de *P. boliviensis* em diversas espécies de animais, encontraram maior eficácia, em tempo de imobilização, em espécies de vertebrados do que de invertebrados, sugerindo que essa espécie, provavelmente, tenha adaptado seu veneno para a captura de vertebrados ao longo de sua evolução. Apesar de seu efeito nocivo em humanos, o veneno das aranhas armadeiras já possui mais de 40



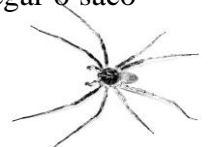
proteínas caracterizadas, muitas delas com potencial farmacológico, tal como o peptídeo PnTx3-5 que apresentou um alto potencial na inibição da dor, mesmo quando testado em animais resistentes à opioides (PEIGNEUR et al., 2018), se mostrando um bom candidato para o desenvolvimento de analgésicos para dores agudas e crônicas (OLIVEIRA et al., 2016)

2.4 – Considerações taxonômicas sobre Ctenidae

Ctenidae abriga atualmente 519 espécies, divididas entre 48 gêneros, e está inserida em Lycosoidea, que abriga 6 outras famílias de aranhas, Lycosidae, Pisauridae, Psecridae, Oxyopidae, Thomisidae e Trechaleidae (POLOTOW; BRESCOVIT, 2015; WHEELER et al., 2016). Embora as relações filogenéticas ainda não estejam completamente resolvidas dentro do clado, alguns esforços têm sido feitos nessa direção. Por meio de filogenias moleculares diversos autores têm conseguido demonstrar as relações evolutivas entre as famílias do grupo, como Wheeler et al. (2016) que evidenciaram uma relação de parentesco muito forte entre Lycosidae e Trechaleidae, apresentando como grupo irmão Pisauridae; essa mesma configuração foi observada por Albo et al. (2017) e Piacentini e Ramírez (2019). Estes mesmos autores ainda estimaram o tempo de divergência das três famílias, que data do Eoceno, entre 60 e 50 milhões de anos aproximadamente.

No entanto, a relação das demais famílias de Lycosoidea ainda permanece confusa. Nos trabalhos de Wheeler et al. (2016) e Piacentini e Ramírez (2019) Oxyopidae aparece como grupo irmão do clado composto por Pisauridae, Trechaleidae e Lycosidae; entretanto, Fernández et al. (2018) em um estudo filogenético realizado com transcriptoma, trazem Ctenidae como grupo irmão desse mesmo clado. Psechridae, por sua vez, também não representou um consenso nas filogenias, estando agrupada externamente com Thomisidae, em Wheeler et al. (2016), ou em posição derivada, com Oxyopidae, por Piacentini e Ramírez (2019) que, por sua vez definem Ctenidae como a segunda família mais ancestral em Lycosidae. Nas três filogenias (WHEELER et al., 2016; FERNÁNDEZ et al. 2018; PIACENTINI; RAMÍREZ, 2019) Thomisidae é considerada a família basal dentro de Lycosoidea, inserida inicialmente na superfamília por Polotow e Brescovit (2015).

Morfologicamente, Ctenidae se distingue das demais famílias de aranhas pelo arranjo ocular, do tipo 2-4-2 (**Fig. 3**) (SILVA-DÁVILA, 2003), embora esta não seja uma característica exclusiva de Ctenidae, ocorrendo também no gênero *Cupiennius* Simon, 1891, recentemente transferido para Trechaleidae por características morfológicas como a presença de espermateca secundária, e marcadores comportamentais, como o hábito de carregar o saco



de ovos presos às fiandeiras (PIACENTINI; REMÍREZ, 2019). A posição de *Cupiennius* dentro Ctenidae já vinha sendo questionada por diversos autores (SILVA-DÁVILA, 2003; POLOTOW; BRESCOVIT, 2015; FERNÁNDEZ et al., 2018). Atualmente, situação semelhante é observada em relação à *Ancylometes*, apesar de ser descrito como pertencente à Ctenidae, por Silva-Dávila (2003), o gênero ainda possui posição incerta em Lycosoidea, uma vez que em filogenias moleculares recentes, ele aparece como grupo irmão da superfamília, fora de Ctenidae (WHEELER et al., 2016).

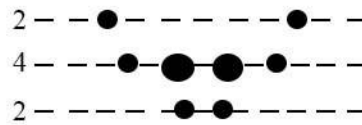
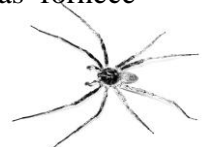


Figura 3. Esquema do padrão de olhos observado em Ctenidae

As filogenias morfológicas mais recentes focadas em resolver as relações evolutivas dentro de Ctenidae (SILVA-DÁVILA, 2003; POLOTOW; BRESCOVIT, 2014; HENRARD; JOCQUÉ, 2017), tem como problema taxonômico mais recorrente o polifiletismo do gênero tipo da família, *Ctenus* Walckenaer, 1805, que sozinho abriga quase 40% das espécies da família (WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Deve-se ressaltar a necessidade de revisão do status taxonômico das suas espécies, pois como evidenciado por diversos autores muitas precisam ser transferidas para outros gêneros (SILVA-DÁVILA, 2003; POLOTOW; BRESCOVIT, 2014; HENRARD; JOCQUÉ, 2017). A exemplo disso, diversos gêneros têm sido criados nos últimos anos, tanto para receber descrições de novas espécies, quanto para abrigar as espécies que estavam mal posicionadas na família, como é o caso de *Macroctenus* Henrard e Jocqué, 2017, *Piloctenus* Henrard e Jocqué, 2017, *Kiekie* Polotow e Brescovit, 2018 e do mais recente *Guasuctenus* Polotow e Brescovit, 2019, dentre outros.

2.5 – Considerações sobre a citogenética de aranhas

Apesar da enorme diversidade observada em Araneae, a citogenética da ordem ainda é muito pouco conhecida sendo que, atualmente, 867 espécies tiveram seu cariótipo estudado (ARAÚJO et al., 2020), menos de 1,7% do total de espécies descritas taxonomicamente. Essa grande lacuna no número de espécies analisadas também se reflete na capacidade de se determinar a relação entre os cariótipos das espécies e quais foram os eventos cromossômicos que ocorreram durante sua diversificação. No entanto, a citogenética de aranhas fornece



promissores modelos de estudos dos cromossomos, como sobre rearranjos cromossômicos complexos, tal qual inversões e translocações (ROWELL, 1990), origem e evolução dos cromossomos sexuais (para revisão ver Araujo et al., 2012), cromossomos supranumerários (ARAUJO et al., 2014, RINCÃO et al., 2017) e cromossomos holocinéticos (KRÁL et al., 2019), dentre outras características presentes nos cariótipos desses animais.

Até o momento, das 120 famílias listadas no World Spider Catalog (2020), 74 já possuem ao menos uma espécie cariotipada, exibindo ampla variação no número diploide, desde $2n♂=5$ em *Afrilobus* sp. (KRÁL et al., 2019), da família Orsolobidae, até $2n♂=152$ em *Caponia natalensis* (O. Pickard Cambridge, 1874), Caponiidae (KRÁL et al., 2019). Além disso, as aranhas também apresentam variação em tipo e morfologia cromossômica. Král et al. (2019) em um extenso estudo em haploginas, determinaram que Dysderoidea, superfamília que abriga Segestridae, Oonopidae, Orsolobidae e Dysderidae (WHEELER et al., 2016), possui como autapomorfia a presença de cromossomos holocinéticos, um tipo raro de cromossomo caracterizado pela ausência de um centrômero com posição definida.

Em relação à morfologia cromossômica, é possível observar em *Heptathela kimura* (Kishida, 1920), a única espécie cariotipada da família Liphistiidae, Mesothelae, cromossomos acrocêntricos (SUZUKI, 1954); apesar disso, as espécies mais basais na filogenia de Opisthothelae, como Mygalomorphae e algumas haploginas, tendem a apresentar cromossomos com dois braços (metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos), enquanto as espécies com características derivadas, como é o caso de Entelegynae, apresentam, geralmente, cromossomos acrocêntricos e telocêntricos. Segundo Král et al. (2013), o fato de tanto Mygalomorphae quanto Haplogynae apresentarem cromossomos com dois braços, sugere que esta morfologia possa ser o padrão ancestral para a subordem Opisthothelae, de modo que o provável cariótipo ancestral para Araneae, ainda não foi bem resolvido.

Král et al. (2013) também notaram que estes grupos que se diversificaram mais cedo na história evolutiva das aranhas, Mygalomorphae e Haplogynae, apresentam um maior número de rearranjos cromossômicos, e, portanto, uma diversidade cariotípica maior. Os autores correlacionaram isso com o fato de que estes clados tem, geralmente, um menor potencial dispersivo, formando aglomerados e sendo mais suscetíveis à eventos de vicariância. Esse menor potencial dispersivo estaria associado, entre outras características, a uma estratégia de dispersão denominada balonismo (KRÁL et al., 2013), que utiliza o ar como mecanismo de dispersão através de uma interação entre aerodinâmica e eletrostática



(MORLEY; ROBERT, 2018), uma estratégia que é praticamente inexistente em Mygalomorphae (FERRETTI et al., 2013).

2.6.1 – Uma breve visão sobre os Sistemas Cromossômicos Sexuais em Aranhas

Em 1900, Wallace descreveu a presença de dois cromossomos acessórios em machos de *Agelenopsis naevia* (WALCKENAER, 1841), corados mais densamente durante a prófase, dispostos na periferia do núcleo, e que segregavam juntos para o mesmo polo durante a anáfase I; essa foi a primeira descrição de cromossomos sexuais em aranhas, termo adotado por King (1925). O sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo X_1X_20 descrito por Wallace (1900) é o mais frequente dentro da ordem (Araujo et al., 2020), e considerado por diversos autores como um caráter plesiomórfico para Araneae, visto que a subordem basal, Mesothelae, apresenta esse mesmo sistema (para revisão, ver Araujo et al., 2012). Diversas propostas de origem desse SCS surgiram ao longo dos anos, mas muitas delas partem de um ancestral $X0$ que, por meio de duplicações (REVELL, 1947), fissões (PÄTAU, 1948), fusões e posterior diferenciação (POSTIGLIONI; BRUM-ZORRILLA, 1981), teria dado origem a dois cromossomos univalentes, que já não apresentam homologia entre si.

De fato, na maioria das espécies, os SCSs são variações de um sistema do tipo X_n0 , onde o zero determina a ausência do cromossomo “Y” no macho, considerado raro nas aranhas (ARAUJO et al., 2012; 2020). Os cromossomos sexuais, geralmente, têm um comportamento bem característico, marcado pela heteropicnose positiva, comportamento univalente e segregação conjunta para a mesma célula filha durante a primeira divisão meiótica (ARAUJO et al., 2012). Durante a meiose I os cromossomos sexuais, nos sistemas X_n0 , tendem a se manter associados, sendo que essa associação pode ocorrer de duas formas: ponta-a-ponta como observado em clados basais de Araneomorphae e em espécies de Mygalomorphae (ARAUJO et al., 2012; KRÁL et al., 2013); ou dispostos em paralelo, como observado na maioria das espécies em Entelegynae (ARAUJO et al., 2012).

Benavente e Wettstein (1980) observaram a presença de uma estrutura proteica similar ao complexo sinaptonêmico, denominada de lâmina de junção, como sendo a responsável por manter os cromossomos sexuais unidos durante a meiose. Evidências recentes apontam ainda que, nas espécies que apresentam sistemas X_n0 , os cromossomos sexuais se posicionam na periferia dos núcleos e segregam juntos para o mesmo polo da célula durante a primeira divisão meiótica, por formarem uma associação precoce com os microtúbulos, associados a um dos cinetócoros (FABIG et al., 2016; AULT et al., 2017).

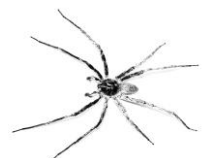


2.6 – Considerações sobre a citogenética de Ctenidae

Apesar de ser uma família de aranhas abundante no Brasil e de sua importância médica, Ctenidae ainda é muito pouco estudada do ponto de vista citogenético, considerando que, até o momento, apenas 11 espécies foram analisadas, correspondendo a 8 gêneros (ARAÚJO et al., 2020), divididos em 4 das 5 subfamílias (POLOTOW; BRESCOVIT, 2014) como mostrado na Tabela 1. As espécies de Ctenidae analisadas até então, apresentaram significativa variação cariotípica, $2n♂ = 22 (20 + X_1X_20)$, $2n♂ = 28 (26 + X_1X_20)$ e $2n♂ = 29 (26 + X_1X_2X_30)$, com morfologia exclusivamente acrocêntrica/telocêntrica, e apenas dois tipos de SCS, X_1X_20 e $X_1X_2X_30$, sem variação congênica. E com apenas uma espécie, *Asthenoctenus borelli* Simon, 1897, diferindo na quantidade de autossomos, com 10 pares autossômicos contra 13 para as demais espécies analisadas da família. Araujo et al. (2014) sugerem que a origem do sistema $X_1X_2X_30$ em Ctenidae possa ter ocorrido, como proposto por Bole-Gowda (1952), por meio de um cromossomo supranumerário, como observado em algumas células de *Ctenus ornatus*, onde este cromossomo extra se comportou de modo similar aos cromossomos sexuais da espécie (ARAÚJO et al., 2014; RINCÃO et al., 2017).

Tabela 1: Dados citogenéticos em espécies da família Ctenidae, retirada de Rincão et al. (2017)

Espécie	Número Diploide (♂) e SCS	Referência
Acantheinae		
<i>Enoploctenus cyclothorax</i> (Bertkau, 1880)	$2n = 26 + X_1X_20$	Rincão et al., 2017
Acanthoeteninae		
<i>Nothroctenus</i> sp.	$2n = 26 + X_1X_2X_30$	Araujo et al., 2014
<i>Viracucha andicola</i> (Simon, 1906)	$2n = 26 + X_1X_2X_30$	Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017
Cteninae		
<i>Anahita fauna</i> Karsch, 1879	$2n = 26 + X_1X_2X_30$	Chen, 1999
<i>Ctenus indicus</i> (Gravely, 1931)	$2n = 26 + X_1X_2X_30$	Kumar et al., 2016
<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891	$2n = 26 + X_1X_20$	Rincão et al., 2017
<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)	$2n = 26 + X_1X_20$	Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017

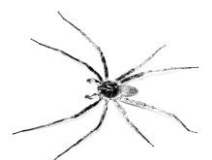


<i>Ctenus</i> sp.	$2n = 26 + X_1X_20$	Araujo et al., 2014
<i>Parabatinga brevipes</i> (Keyserling, 1891)	$2n = 26 + X_1X_20$	Araujo et al., 2014
<i>Phoneutria nigriventer</i> (Keyserling, 1891)	$2n = 26 + X_1X_20$	Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017
Viridasiinae		
<i>Asthenoctenus borelii</i> Simon, 1897	$2n = 20 + X_1X_20$	Araujo et al., 2014

Embora o emprego de outras metodologias sejam escassas em aranhas, a maioria das espécies de Ctenidae com análises citogenéticas também apresentam dados sobre regiões organizadoras de nucléolo (RONs), seja por meio da impregnação com nitrato de prata (AgRONs) ou por meio da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), utilizando sondas de DNAr 18S. Araujo et al. (2014), por exemplo, definiram AgRONs para três espécies, sendo simples, no par 10 para *Ctenus ornatus* e *Phoneutria nigriventer*, e múltiplas, nos pares 6 e 10 pares para *Viracucha andicola*. Kumar et al. (2016) encontraram RONs múltiplas em *Ctenus indicus*, nos pares 8 e 10, assim como Rincão et al. (2017) para *Phoneutria nigriventer*, em 3 bivalentes. Estes mesmos autores observaram RONs simples em *Ctenus ornatus*, *Ctenus medius*, *Enoploctenus cyclothorax* e *V. andicola*, não evidenciando nenhum padrão aparente dentro da família.

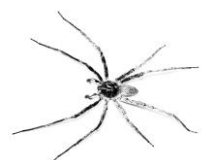
Outros dados citogenéticos em Ctenidae estão restritos à investigação de heterocromatina constitutiva, por bandeamento C, como realizada por Kumar et al. (2016) em *Ctenus indicus*, onde os autores observaram a presença de bloco heterocromáticos restritos, principalmente, às regiões terminais e pericentroméricas. Rincão et al. (2017) observaram padrão semelhante em *E. cyclothorax*, *V. andicola*, *P. nigriventer* e *C. medius*, onde apenas *C. ornatus* apresentou um perfil diferenciado, com diversos blocos de heterocromatina dispersos em regiões intersticiais de todos os cromossomos do complemento. Rincão et al. (2017) ainda determinaram a composição da heterocromatina, por meio da coloração base-específica com cromomicina A₃ (CMA₃), evidenciando uma composição rica em bases GC, nas cinco espécies analisadas.

Apesar dos resultados cariotípicos obtidos em Ctenidae, seja por análise meiótica convencional ou por técnicas de bandeamento cromossômico citadas acima, o baixo número



de espécies amostradas na família, bem como a presença de um cariótipo relativamente conservado, dificulta o estabelecimento de propostas acerca da evolução cariotípica do grupo. Essa dificuldade existe tanto dentro das cinco subfamílias, considerando ainda que Calocteninae permanece citogeneticamente desconhecida, quanto dentro dos próprios gêneros, uma vez que grande parte das espécies analisadas até o momento encontram-se em grupos distintos filogeneticamente dentro de Ctenidae, segundo a filogenia proposta por Polotow e Brescovit (2014). Essa lacuna evidencia a necessidade de que sejam analisadas citogeneticamente mais espécies, e descritos novos marcadores cromossômicos que auxiliem na citotaxonomia do grupo

.



3 - Objetivos Geral e Específico

Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo descrever o uso de marcadores cromossômicos que possam ser úteis na investigação de rearranjos cromossômicos que possam atuado durante a evolução cariotípica da família, caracterizando um perfil citogenético para diferentes espécies de Ctenidae.

Objetivos Específicos

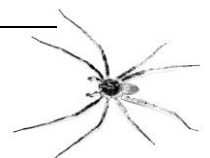
- Caracterizar citogeneticamente 10 espécies de Ctenidae encontradas em oito locais de coleta diferentes: *Ancylometes concolor*, *Ctenus ornatus*, *C. medius*, *Guasuctenus longipes*, *Isoctenus corymbus*, *I. coxalis*, *I. herteli*, *I. janeirus*, *I. ordinario* e *I. strandi*;
- Identificar os padrões de dispersão das bandas heterocromáticas;
- Investigar a distribuição dos sítios de DNAr 18S;
- Utilizar sondas de histona H3 como potencial marcador cromossômico;
- Evidenciar possíveis características ancestrais nos cariótipos das espécies, com base em sua ocorrência dentro dos grupos analisados, e nos grupos externos mais próximos, que possuam dados citogenéticos.

4 - Material e Locais de Coleta

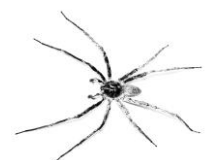
Neste trabalho foram analisados um total de 181 aranhas, de 10 espécies e 4 gêneros, coletados em 8 diferentes locais de coletas, no Paraná, como apresentado e no Pantanal do Mato Grosso do Sul (**Tabela 2** e **Figura 4**): i - Base de Estudos do Pantanal, UFMS, Corumbá-MS; ii - Parque Nacional do Superagui, Guaraqueçaba-PR; iii – Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu-PR; iv – Parque Nacional de Ilha Grande, Icaraíma-PR; v – Parque Nacional de Saint/Hilaire-Lange; vi – Parque Estadual do Guartelá, Tibagi-PR; vii – Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa-PR; viii – Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina-PR. As imagens das espécies analisadas estão apresentadas na **Figura 5**, exceto para *Isoctenus herteli*, *I. corymbus* e *I. strandi*.

Table 2. Espécies coletadas, distribuídas por sexo e local de coleta. PARNA = Parque Nacional

Espécie	Amostra	Local de Coleta
---------	---------	-----------------



	♂	♀	
<i>Ancylometes concolor</i> (Perty, 1833)	13	6	Base de Estudos do Pantanal – UFMS W 57° 01' 08,70", S 19° 34' 36,90"
	8		PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
	2		PARNA de Foz do Iguaçu W 54° 28' 35,40", S 25° 37' 34,00"
<i>Guasuctenus longipes</i> Polotow e Brescovit, 2019	4	2	PARNA de Ilha Grande W 53° 44' 38,80", S 23° 21' 12,50"
	12	2	PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891	3	-	Parque Estadual Mata dos Godoy W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37"
	12	2	PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
<i>C. ornatus</i> (Keyserling, 1877)	10	-	Parque Estadual Mata dos Godoy W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37"
	7	2	PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
<i>Isoctenus corymbus</i> Polotow, Brescovit e Pellegatti-Franco, 2005	17	1	Parque Estadual Mata dos Godoy W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37"
	2	4	PARNA de Saint-Hilaire/Lange W 48° 33' 47,50", S 25° 48' 42,30"
<i>I. coxalis</i> (F. O. Pickard-Cambridge, 1902)	6	1	PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
	1	1	PARNA de Saint-Hilaire/Lange W 48° 33' 47,50", S 25° 48' 42,30"
	2	4	Parque Estadual de Vila Velha W 50° 00' 11,30", S 25° 15' 15,40"
	3	5	Parque Estadual do Guartelá W 50° 15' 35,80", S 24° 33' 50,10"
<i>I. herteli</i> (Mello-Leitão, 1947)	12	1	Parque Estadual de Vila Velha W 50° 00' 11,30", S 25° 15' 15,40"
	3	2	PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
<i>I. janeirus</i> (Walckenaer, 1837)	5		PARNA de Saint-Hilaire/Lange W 48° 33' 47,50", S 25° 48' 42,30"
	4	1	PARNA de Foz do Iguaçu W 54° 28' 35,40", S 25° 37' 34,00"
<i>I. ordinario</i> Polotow e Brescovit, 2009	4	7	Parque Estadual Mata dos Godoy W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37"
	4		PARNA de Superagui W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
<i>I. strandi</i> Mello-Leitão, 1936	4	2	PARNA de Saint-Hilaire/Lange W 48° 33' 47,50", S 25° 48' 42,30"



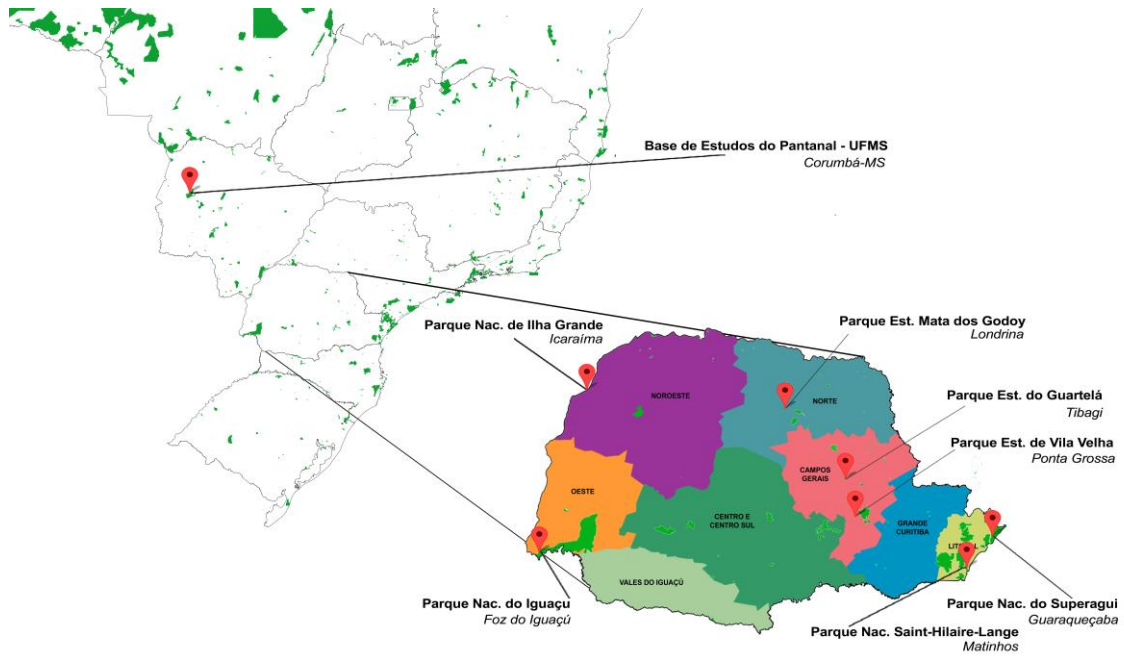
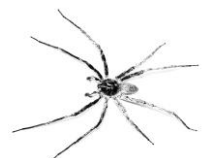


Figura 4: Mapa mostrando os oito locais de coleta amostrado no presente estudo, distribuídos entre os estados do Paraná, em destaque, e do Mato Grosso do Sul.



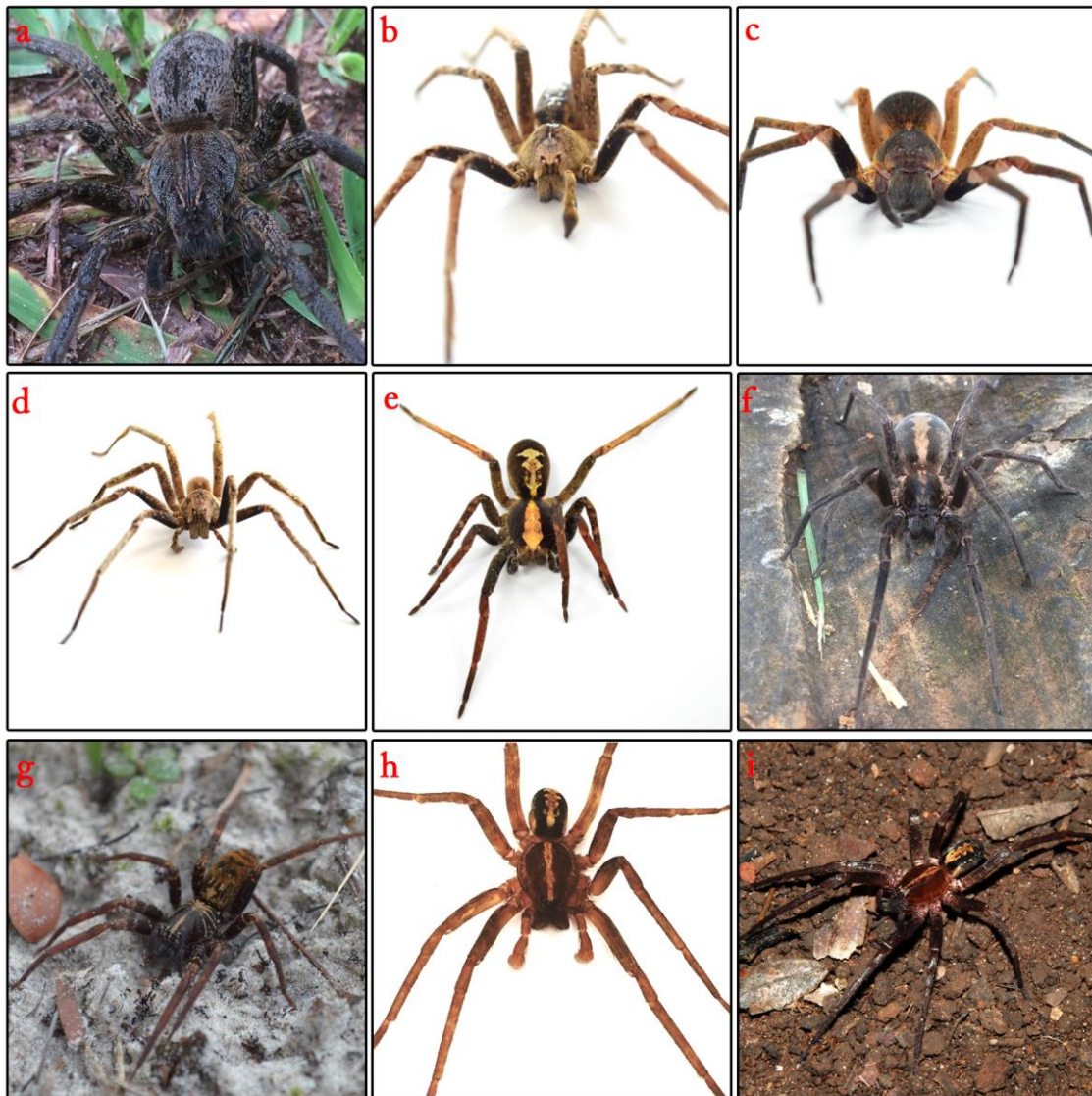
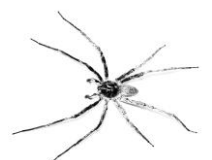
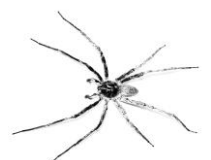


Figura 5: Imagens das espécies analisadas no presente trabalho. **a** *Ancylometes concolor* ♀; **b-c** *Ctenus medius*, ♂ e ♀ respectivamente; **d-e** *C. ornatus*, ♂ e ♀ respectivamente; **f** *Guasuctenus longipes* ♀, **g** *Isoctenus janeirus* ♀, **h** *I. ordinário* ♂, **g** *I. cf. coxalis* ♂ (imagem de Pedro H. Martins).

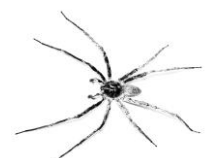


5 - Referências

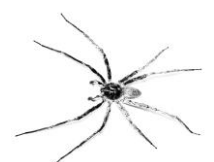
- ALBO, M. J., BIDEGARAY-BATISTA, L., BECHSGAARD, J., SILVA, E. L. C., BILDE, T., PÉREZ-MILES, F. (2017). Molecular Phylogenetic Analyses Show that Trechaleidae and Lycosidae are Sister Groups. *Arachnology*, 17(4), 169–176. <https://doi.org/10.13156/arac.2017.17.4.169>
- ARAUJO, D., SCHNEIDER, M. C., PAULA-NETO, E., CELLA, D. M. (2012). Sex Chromosomes and Meiosis in Spiders: A Review. In A. Swan (Ed.), *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity* (pp. 87–108).
- ARAUJO, D., OLIVEIRA, E. G., GIROTI, A. M., et al. (2014). Comparative Cytogenetics of Seven Ctenidae Species (Araneae). *Zoological Science*, 31(2), 83–88. <https://doi.org/10.2108/zsj.31.83>
- ARAUJO, D.; SCHNEIDER, M.C.; PAULA-NETO, E.; CELLA, D.M. (2020). The spider cytogenetic database. Online at: www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase. Accessed on 10/01/2020
- AULT, J. G., FELT, K. D., DOAN, R. N., et al. (2017). Co-segregation of sex chromosomes in the male black widow spider *Latrodectus mactans* (Araneae, Theridiidae). *Chromosoma*, 126(5), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0628-7>
- BENAVENTE, R., WETTSTEIN, R. (1980). Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage. *Chromosoma*, 77(1), 69–81. <https://doi.org/10.1007/BF00292042>
- BLOOM, T., BINFORD, G., A. ESPOSITO, L., et al. (2014). Discovery of two new species of eyeless spiders within a single Hispaniola cave. *Journal of Arachnology*, 42(2), 148–154. <https://doi.org/10.1636/k13-84.1>
- BOLE-GOWDA, B. N. (1952). Studies in the chromosomes and the sex-determining mechanism in four hunting spiders (Sparassidae). *Proceedings of the Zoological Society Bengal*, 5, 51–70.
- BRESCOVIT, A. D., OLIVEIRA, U.; SANTOS, A. J. (2011). Aranhas (Araneae, Arachnida) do Estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. *Biota Neotropica*, 11, 717-747. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500035>
- CHAVARI, J. L., CIPOLA, N. G., BRESCOVIT, A. D. (2014). Records of spiders (Arachnida: Araneae) of the parque estadual mata São Francisco, Paraná, Brazil. *Check List*, 10(6), 1435–1444. <https://doi.org/10.15560/10.6.1435>
- CHEN, S. H. (1999). Cytological Studies on Six Species of Spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, and Ctenidae). *Zoological Studies*, 38(4), 423–434.
- CODDINGTON, A., LEVI, W. (1991). Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22(1), 565–592.



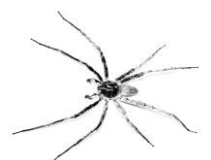
- DEACON, A. E., FARRELL, A. D., FRASER, D. F. (2015). Observations of a Semi-Aquatic Spider Attack: An Overlooked Fish Predator in a Well-Studied Ecosystem? *Living World, Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*, 57–59.
- DIAS, S. C., CARVALHO, L. S., BONALDO, A. B., BRESCOVIT, A. D. (2010). Refining the establishment of guilds in Neotropical spiders (Arachnida: Araneae). *Journal of Natural History*, 44(3–4), 219–239. <https://doi.org/10.1080/00222930903383503>
- DINIZ, M. R. V., PAIVA, A. L. B., GUERRA-DUARTE, C., et al. (2018). An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *PLoS ONE*, 13(8), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200628>
- FABIG, G., MÜLLER-REICHERT, T., PALIULIS, L. V. (2016). Back to the roots: segregation of univalent sex chromosomes in meiosis. *Chromosoma*, 125(2), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0550-9>
- FERNÁNDEZ, R., KALLAL, R. J., DIMITROV, D., et al. (2018). Phylogenomics, Diversification Dynamics, and Comparative Transcriptomics across the Spider Tree of Life. *Current Biology*, 28(9), 1489–1497.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.064>
- FERRETTI, N., POMPOZZI, G., COPPERI, S., SCHWERDT, L. (2013). Aerial dispersal by *Actinopus spiderlings* (Araneae: Actinopodidae). *Journal of Arachnology*, 41(3), 407–408. <https://doi.org/10.1636/j13-27.1>
- FOELIX, R. F. (2011). *Biology of Spiders*. OUP USA.
- FOLLY, H., ARRUDA, L. F., GOMES, V. F., NEVES, M. O., FEIO, R. N. (2017). Predation on *Oloolygon carnevallii* (Caramaschi and Kisteumacher, 1989) (Anura, Hylidae) by *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) (Araneae, Ctenidae). *Herpetology Notes*, 10(0), 365–367.
- FOLT, B., LAPINSKI, W. (2017). New observations of frog and lizard predation by wandering and orb-weaver spiders in Costa Rica. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 16(2), 269. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v16i2p269-277>
- FUNK, D. J., OMLAND, K. E. (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- GRISWOLD, C. E., RAMÍREZ, M. J., CODDINGTON, J. A., PLATNICK, N. I. (2005). Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae) with comments on their phylogeny. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 56(2), 1–324. Retrieved from <http://si-pddr.si.edu/jspui/handle/10088/14866>
- HAZZI, N. A., POLOTOW, D., BRESCOVIT, A. D., GONZÁLEZ-OBANDO, R., SIMÓ, M. (2018). Systematics and biogeography of *Spinoctenus*, a new genus of wandering spider from Colombia (Ctenidae). *Invertebrate Systematics*, 32(1), 111–158. <https://doi.org/10.1071/IS17022>



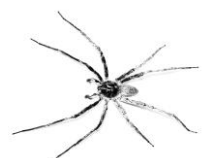
- HENRARD, A., JOCQUÉ, R. (2017). Morphological and molecular evidence for new genera in the Afrotropical Cteninae (Araneae, Ctenidae) complex. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 180(1), 82–154. <https://doi.org/10.1111/zoj.12461>
- HÖFER, H., BRESOVIT, A. D. (2000). A revision of the Neotropical spider genus *Ancylometes* Bertkau (Araneae: Pisauridae). *Insect Systematics & Evolution*, 31(3), 323–360. <https://doi.org/10.1163/187631200X00075>
- JÄGER, P. (2012). Revision of the genus *Sinopoda* Jäger, 1999 in Laos with discovery of the first eyeless huntsman spider species (Sparassidae: Heteropodinae). *Zootaxa*, 57(3415), 37–57. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3415.1.3>
- JIMENEZ, M. L., BERRIAN, J. E., POLOTOW, D., PALACIOS-CARDIEL, C. (2017). Description of *Califorctenus* (Cteninae, Ctenidae, Araneae), a new spider genus from Mexico. *Zootaxa*, 4238(1), 97–108. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4238.1.7>
- KING, S. D. (1925). Spermatogenesis in a Spider (*Amaurobius* sp.). *Nature*, 116, 574–575. <https://doi.org/10.1038/116574b0>
- KOŘÍNKOVÁ, T., KRÁL, J. (2013). Karyotypes, Sex Chromosomes, and Meiotic Division in Spiders. In W. Nentwig (Ed.), *Spider Ecophysiology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33989-9>
- KRÁL, J., MUSILOVÁ, J., ŠT'ÁHLAVSKÝ, F., ŘEZÁČ, M., AKAN, Z., EDWARDS, R. L., et al. (2006). Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research*, 14(8), 859–880. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1095-9>
- KRÁL, J. (2007). Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. *Chromosome Research*, 15(7), 863–879. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1169-3>
- KRÁL, J., KOŘÍNKOVÁ, T., KRKAVCOVÁ, L., MUSILOVÁ, J., et al. (2013). Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2), 377–408. <https://doi.org/10.1111/bij.12056>
- KRÁL, J., FORMAN, M., KOŘÍNKOVÁ, T., et al. (2019). Insights into the karyotype and genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39034-3>
- KUMAR, S. A., VENU, G., JAYAPRAKASH, G., VENKATACHALAI AH, G. (2016). Studies on chromosomal characteristics of *Ctenus indicus* (Gravely 1931) (Araneae: Ctenidae). *Nucleus (India)*, 60(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0191-2>
- LIN, Y., LI, S., JÄGER, P. (2018). Tetrablemmidae, a spider family newly recorded from Cambodia (Arachnida, Araneae). *ZooKeys*, 2018(777), 43–55. <https://doi.org/10.3897/zookeys.777.24917>



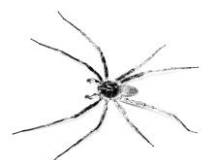
- MALAQUE, C. M. S., CHAIM, O. M., ENTRES, M., BARBARO, K. C. (2016). Loxosceles and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation, and Treatment. In *Spider Venoms* (pp. 419–444). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2020). Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde. Brasil, online at <http://portalsinan.saude.gov.br/>, accessed on 10/01/2020
- MORLEY, E. L., ROBERT, D. (2018). Electric Fields Elicit Ballooning in Spiders. *Current Biology*, 28(14), 2324-2330.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.057>
- MOURA, M. R., AZEVEDO, L. P. (2011). Observation of predation of the giant fishing spider *Ancylometes rufus* (Walckenaer, 1837) (Araneae, Ctenidae) on *Dendropsophus melanargyreus* Cope, 1877 (Anura Hylidae). *Biota Neotropica*, 11(4), 1–3.
- MURPHY, J. A., ROBERTS, M. J. (2015). Spider Families of the World and their Spinnerets. *British Arachnological Society*, 2, 191–553.
- NYLANDER, J. A. A., RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. P., NIEVES-ALDREY, J. L. (2004). Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, 53(1), 47–67. <https://doi.org/10.1080/10635150490264699>
- OLIVEIRA, S. M., SILVA, C. R., TREVISAN, G., et al. (2016). Antinociceptive effect of a novel armed spider peptide Tx3-5 in pathological pain models in mice. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 468(5), 881–894. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1801-1>
- OLIVEIRA, U., SANTOS, A., BRESCOVIT, A. (2011). Aranhas (Araneae, Arachnida) do Estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. *Biota Neotropica*, 11(1A), 717–747. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199120113027>
- PÄTAU, K. (1948). X-segregation and heterochromasy in the spider *Aranea reaumuri*. *Heredity*, 2, 77–100. <https://doi.org/10.1038/hdy.1948.5>
- PEIGNEUR, S., LIMA, M. E., TYTGAT, J. (2018). Phoneutria nigriventer venom: A pharmacological treasure. *Toxicon*, 151, 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.008>
- PIACENTINI, L. N., RAMÍREZ, M. J. (2019). Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.004>
- PLATNICK, N. I. 2001. The world spider catalog, version 2.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog81-87/index.html>, accessed on 10/01/2020.



- POLOTOW, D., BRESOVIT, A. D. (2014). Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170, 333–361. <https://doi.org/10.1111/zoj.12101>
- POLOTOW, D., CARMICHAEL, A., GRISWOLD, C. E. (2015). Total evidence analysis of the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae). *Invertebrate Systematics*, 29(2), 124–163. <https://doi.org/10.1071/IS14041>
- POLOTOW, D., BRESOVIT, A. D. (2018). Kiekie, a new Neotropical spider genus of Ctenidae (Cteninae, Araneae). *Zootaxa*, 4531(3), 353–373. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4531.3.2>
- POLOTOW, D., BRESOVIT, A. D. (2019). Guasuctenus gen. Nov., a new Neotropical spider genus of Ctenidae (Araneae). *Zootaxa*, 4624(4), 539–550. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4624.4.6>
- POSTIGLIONI, A., BRUM-ZORRILLA, N. (1981). Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus Lycosa (Araneae-Lycosidae). *Genetica*, 56(1), 47–53. <https://doi.org/10.1007/BF00126929>
- RAIZER, J., BRESOVIT, A. D., de OLIVEIRA, U., SANTOS, A. J. (2017). Diversidade e composição da araneofauna do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia - Serie Zoologia*, 107, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e20171109>
- REVELL, S. H. (1947). Controlled X-segregation at meiosis in Tegenaria. *Heredity*, 1(3), 337–347. <https://doi.org/10.1038/hdy.1947.21>
- RIBEIRO, M. C., MARTENSEN, A. C., METZGER, J. P., et al. (2011). The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. *Biodiversity Hotspots*, 405–434. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5>
- RINCÃO, M. P., CHAVARI, J. L., BRESOVIT, A. D., DIAS, A. L. (2017). Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): Detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comparative Cytogenetics*, 11(4), 627–639. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.10620>
- ROWELL, D. M. (1990). Fixed fusion heterozygosity in Delena cancerides Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. *Genetica*, 80(2), 139–157. <https://doi.org/10.1007/BF00127134>
- SÁNCHEZ-RUIZ, A., BRESOVIT, A. D., ALAYÓN, G. (2015). Four new caponiids species (Araneae, Caponiidae) from the West Indies and redescription of Nops blandus (Bryant). *Zootaxa*, 3972(1), 43–64. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3972.1.3>
- SCARANO, F. R., CEOTTO, P. (2015). Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. *Biodiversity and Conservation*, 24(9), 2319–2331. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0972-y>



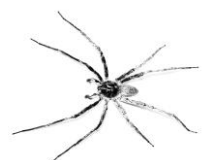
- SILVA DAVILA, D. (2003). Higher-Level Relationships of the Spider Family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 274, 1–86. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2003\)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2003)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2)
- VALENZUELA-ROJAS, J. C., GONZÁLEZ-GÓMEZ, J. C., VAN DER MEIJDEN, A., et al. (2019). Prey and Venom Efficacy of Male and Female Wandering Spider, *Phoneutria boliviensis* (Araneae: Ctenidae). *Toxins*, 11(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins11110622>
- WALLACE, L. B. (1900). The Accessory Chromosome in the Spider. *Anatomischer Anzeiger*, 18, 327–329.
- WHEELER, W. C., CODDINGTON, J. A., CROWLEY, L. M., DIMITROV, D., et al. (2016). The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 33(6), 574–616. <https://doi.org/10.1111/cla.12182>
- WILLEMART, R. H., KANETO, G. E. (2004). On the natural history of the Neotropical spider *Enoploctenus cyclothorax* (Araneae, Ctenidae). *Bulletin of the British Arachnological Society*, 13(2), 53–59.
- WORLD SPIDER CATALOG (2020). World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 10/01/2020. doi: 10.24436/2



6 - CAPÍTULO 1

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

Enviado para publicação na PlosOne.



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

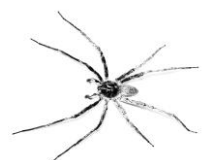
Matheus Pires Rincão^{1*}, Antonio Domingos Brescovit², Ana Lúcia Dias¹

¹Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Londrina - Brazil. ² Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo - Brasil.

Short title: Mapping 18S rRNA and Histone H3 genes distribution in three Cteninae species.

Corresponding author: Matheus Pires Rincão

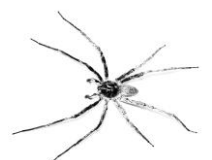
Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Londrina, PR 86051-970, Brazil. E-mail rincaom@gmail.com



Abstract

Ctenidae represents one of the most representative spider families in the tropical forests of Brazil. Its largest genus, *Ctenus*, has approximately 220 species out of the more than 520 Ctenidae species described, and several authors consider it polyphyletic. Chromosomal data are available only for four species of the genus, representing a large gap in the cytogenetic knowledge about the group. This study provided cytogenetic data on two *Ctenus* species and one *Guasuctenus* (previously described as *Ctenus*). All showed $2n\sigma=28$ ($26+X_1X_20$). *Guasuctenus longipes* presented two chromosome pairs containing 18S rDNA genes, however, *C. medius* and *C. ornatus* showed only one chromosome pair with the 18S rDNA gene. Hybridization data using histone H3 probe indicated specific profiles: histone H3 genes were found in one chromosome pair in *G. longipes*, in three pairs in *C. medius*, and in four pairs in *C. ornatus*. Furthermore, supernumerary chromosomes were identified in *C. ornatus* presenting a meiotic behavior similar to that of sex chromosomes; and a trivalent was found in *C. medius*, formed by the association of one sex chromosome and an autosomal bivalent, indicating the importance of these events for the diversification of sex chromosomes in spiders. The C-banding pattern was similar between *C. medius* and *C. ornatus* with regard to the number and locations of heterochromatic bands, suggesting that heterochromatin amplification and dispersion affect karyotypic evolution in the genus. Cytogenetic data showed similarity between *C. medius* and *C. ornatus*, and differentiation of *G. longipes* congruent with morphological data. Moreover, although more comparative analyses are needed to specify composition of the dispersed heterochromatin in *Ctenus*, the mapping of heterochromatic bands provided insights about the evolution of the karyotypes in this genus.

Keywords: sex chromosomes; FISH; spider cytogenetics; Lycosoidea; wandering spider.



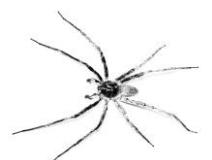
6.1 - Introduction

Ctenidae are one of the best-known spider families worldwide and contain species of medical interest, such as those of the genus *Phoneutria*, popularly known as “banana spider” or “armed spider.” This family has 48 genera and approximately 520 species [1] and is usually found in tropical forests. Based on morphological and molecular data, Ctenidae belong to the superfamily Lycosoidea, together with Oxyopidae, Thomisidae, Psechridae, Trechaleidae, Pisauridae, and Lycosidae [2, 3]; it constitutes the third largest clade of this superfamily.

The genus *Ctenus*, proposed by Walckenaer in 1805, contains more than 200 currently known species, corresponding to approximately 40% of the number of species in Ctenidae [1], and it is considered polyphyletic [3, 4, 5, 6, 7]. Polotow and Brescovit [7], in a study involving 32 species of *Ctenus*, showed that for genus to be considered monophyletic, 19 species should be transferred to other genera. Regarding these results, *C. longipes* was recently transferred to *Guasuctenus* Polotow and Brescovit [8], that presents today two Neotropical species [1].

Only four species of *Ctenus* have been karyotyped until date, representing less than 2% of the species described in the genus, indicating a significant gap in the cytogenetic knowledge about the group. *Ctenus indicus* (Gravely 1931), *C. medius* Keyserling 1891, *C. ornatus* (Keyserling 1877), and *Ctenus* sp. have 28 acrocentric/telocentric chromosomes ($2n♂ = 26 + X_1X_20$) [9, 10, 11]. Of these four species, three have data on nucleolar organizer regions (NORs) evidenced by either impregnation with silver nitrate (*C. ornatus* [9] and *C. indicus* [10]) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (*C. ornatus* and *C. medius* [11]). *Ctenus indicus* is the only species with multiple NORs.

Analysis of heterochromatin distribution was also important for characterization of *Ctenus* species, since only *C. ornatus* presented interstitial heterochromatic blocks [11], while the other species of the genus presented centromeric/pericentromeric regions throughout the chromosome complement, with terminal blocks on the long arm of some chromosomes. The latter profile was observed by Rincão et al. [11] in other species of the family, including



Enoploctenus cyclothorax (Bertkau 1880), *Viracucha andicola* (Simon, 1906) and *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891).

The scarcity of chromosomal data in other species of the genus limits establishing evolutionary relationships between karyotypes. The objective of this study was to provide for the first time the cytogenetic description of *Guasuctenus longipes* and new populations of *Ctenus medius* and *C. ornatus* to investigate, using chromosomal markers, the events that may have occurred during karyotype differentiation in these species and to correlate the results with cytogenetic and phylogenetic data available for this group.

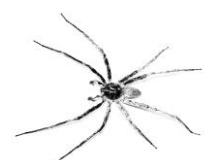
6.2 - Material and Methods

6.2.1 - Sample Collection

Males and females, adults and juveniles, of three ctenid species, *Guasuctenus longipes*, *Ctenus medius* and *C. ornatus*, were collected in two conservation units, Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) and Parque Nacional do Superagui (PNS), state of Paraná, Brazil, as showed in **Table 1**. Sampling was performed with the permission of Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/SISBIO) license number 42728-5. The specimens were stored in ethanol 70% and deposited in the arachnological collection of the Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Intituto Butantan (IBSP, curator AD Brescovit), São Paulo/SP, Brazil (**Table S1**).

Table 1. Species analyzed and collection sites. PNS = Parque Nacional de Superagui, Guaraqueçaba-PR, W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"; PEMG = Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina-PR, W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37".

Species	Sample		Collection Sites
	♂	♀	
<i>Guasuctenus longipes</i> Polotow e Brescovit, 2019	12	2	PNS
	3	-	PEMG
<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891	14	2	PNS
	10	-	PEMG
<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)	7	2	PNS
	17	1	PEMG



6.2.2 - Cytogenetic analyses

Chromosomal preparations followed the protocol described by Araujo et al. [12], using testicles, ovaries and intestinal ducts. To assembly of the slides the tissue was treated and macerated in 60% acetic acid, then the slide was heated in a metal plate at 40° C. The diploid number was determined by counting 30 mitotic or meiotic cells. Chromosomes was classified according to Levan et al. [13]. C-banding followed Sumner [14], with the modifications proposed by Lui et al [15]: slides were stained with propidium iodide and photographed in gray scale. Staining with base-specific fluorochromes Chromomycin A3 (CMA3) and 4', 6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) followed the protocol described by Schweizer [16].

Chromosomal measurements for assembling karyotypes were performed in around 10 mitotic metaphases, using the MicroMeasure software, version 3.3 [17]. Sex chromosome systems were defined by comparing the mitotic metaphase measures and the $X_1:X_2$ size ratio in meiosis. For that were measured 30 meiotic cells. To determine the frequency of supernumerary chromosomes were analyzed 30 meiotic and mitotic cells.

6.2.3 - Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

FISH was performed according to Schwarzacher and Heslop-Harrison [18], 18S rDNA probes were obtained from *Ctenus ornatus* by Rincão et al. [11], amplified from the plasmid DNA by PCR with the M13 primer pair, labeled with the Biotin-Nick Translation Mix (Roche) kit and detected with Avidin-FITC (Invitrogen). Histone H3 probes were obtained by amplifying the genomic DNA of *Ctenus ornatus*, with the aid of primers described by Colgan et al. [19]. The obtained fragments were cloned using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), in competent *Escherichia coli* strain (TOP 10). The insert was amplified by M13 primer pair for sequencing in ABIprism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sequences were analyzed using BioEdit version 7.2.5 software [20]. A 370 bp consensus sequence was obtained, which was aligned on GenBank to confirm homology to other previously described histone H3 sequences for spiders (accession number for five first sequences with more than 90% of identity: KM225235.1, EF419126.1, KT794277.1, KM225237.1, KM225234.1). H3 probes were then labeled by PCR, using the M13 primer pair, with the Cy3 dUTP (GE Healthcare).



FISH slides were counterstained with DAPI and analyzed on the Leica DM2000 epifluorescence microscope equipped with a Moticam Pro 282B digital camera. The images were captured using Motic Images Advanced software, version 3.2.

6.3 - Results

6.3.1 - *Guasuctenus longipes*

G. longipes showed $2n = 28$ ($26 + X_1X_20$) in males (Fig. 1a) and $2n = 30$ ($26 + X_1X_1X_2X_2$) in females (Fig. 1b). All chromosomes were acrocentric and the autosomal complement gradually decreasing in size. The $X_1:X_2$ size ratio obtained of meiotic cells showed that X_2 sex chromosome corresponds to 79% of the X_1 length. Therefore, the X_1 and X_2 sex chromosomes corresponds, respectively, to the largest and medium-sized chromosomes of the complement (Figs. 1a, b). FISH technique indicated chromosomal pairs 9 and 11 carrying the 18S rDNA genes and pair 4 carrying the histone H3 genes (Fig. 1, boxes), all these sites were present in the terminal region of the long arm of the chromosomes.



Fig. 1 Male and female karyotypes of *Guasuctenus longipes* with conventional staining Giemsa (**a**, **b**, respectively); male karyotype after C banding (**c**), arrow points to the terminal heterochromatic blocks on the long arm of pair 4. Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and histone H3 (red). Scale bar = 10 μ m.

C-banding technique indicated the presence of heterochromatic blocks in the centromeric region of all chromosomes and small blocks in the terminal region of the long

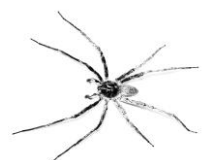


arm of pair 4 (Fig. 1c). Fluorochromic staining showed regions DAPI⁻ and CMA₃⁺ (Fig. 5b), which were coincident with heterochromatic blocks.

Meiotic analyses in *G. longipes* indicated isopycnotic sex chromosomes in pachytene cells in females (Fig. S1a). In males, sex chromosomes showed positive heteropycnosis and parallel association in the early stages of meiosis (Figs. S1b–d). Metaphase II and anaphase II cells in males showed cells with 13 or 15 chromosomes, confirming the X₁X₂0 sex chromosome system (SCS) (Figs. S1e, f). In addition, satellites were found in association at the stage of diplotene in homologous and non-homologous chromosomes, of all specimens collected in the Parque Nacional de Superagui (PNS) (Figs. S1g, h) and coincided with 18S rDNA sequences (pairs 9 and 11) (Figs. S1g, h-box).

6.3.2 - *Ctenus medius*

C. medius exhibited $2n = 28$ ($26 + X_1X_20$) in males (Fig. 2a) and $2n = 30$ ($26 + X_1X_1X_2X_2$) in females (Fig. 2b). All chromosomes were acrocentric and the autosomal complement gradually decreasing in size. The X₁:X₂ size ratio obtained of meiotic cells showed that X₂ sex chromosome corresponds to 90% of the X₁ chromosome length. Therefore, the X₁ and X₂ sex chromosomes were identified as the largest chromosomes of the diploid set (Figs. 2a, 2b). FISH technique indicated chromosome pair 13 carrying 18S rDNA genes and pairs 5, 7 and 9 carrying histone H3 genes (Fig. 2, boxes); all sites were present in the terminal region of the long arm of the chromosomes.



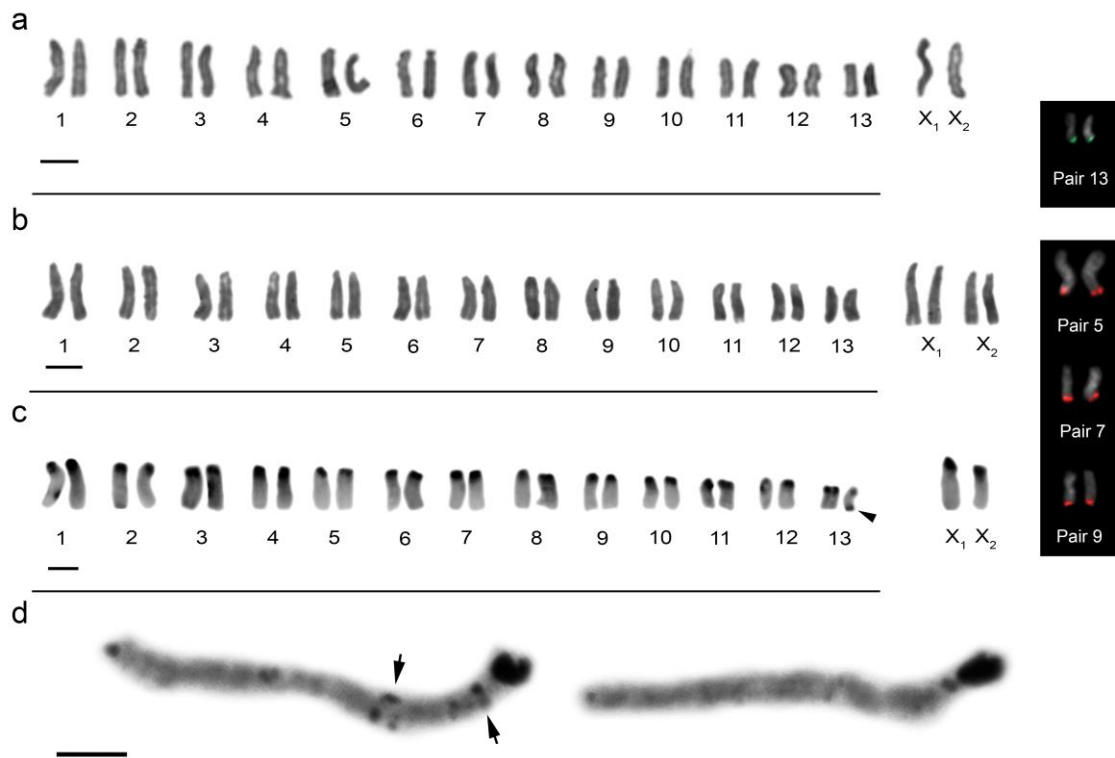
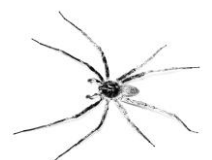


Fig. 2 Male and female karyotypes of *Ctenus medius* with conventional staining Giemsa (**a**, **b**, respectively); male karyotype after C banding (**c**) arrowhead points the terminal heterochromatic block on the long arm of one chromosome of the pair 13; two bivalents in pachytene after C-banding, arrows show interstitial heterochromatin in one of them (**d**). Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and Histone H3 (red). Scale bar = 10 μ m.

C-banding analyses showed that large heterochromatic blocks were located in the centromeric region of all chromosomes (Fig. 2c) and in the terminal region of one chromosome of pair 13. However, cells in the pachytene indicated that some bivalent chromosomes had small heterochromatin dots in interstitial regions (Fig. 2d). The base-specific staining evidenced regions CMA_3^+ and DAPI, coincident with the heterochromatin (Figs. 5c, d).

Meiotic analyses in *C. medius* indicated isopycnotic sex chromosomes in pachytene cells of females (Fig. S2a). In males, sex chromosomes exhibited positive heteropycnosis and parallel association in the early stages of meiosis (Figs. S2b–d). Metaphases II showed cells with 13 or 15 chromosomes, confirming X_1X_20 SCS (Figs. S2e, f). In one specimen from the population of Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), we observed a trivalent formed from the association between the sex chromosome X_2 and an autosomal bivalent chromosome (Figs. S2g, h). C-banding analyses indicated the pairing of an autosomal bivalent with sex



chromosome X_2 in the short arm (Fig. 3a). A graphical representation of the trivalent is shown in Fig. 3b.

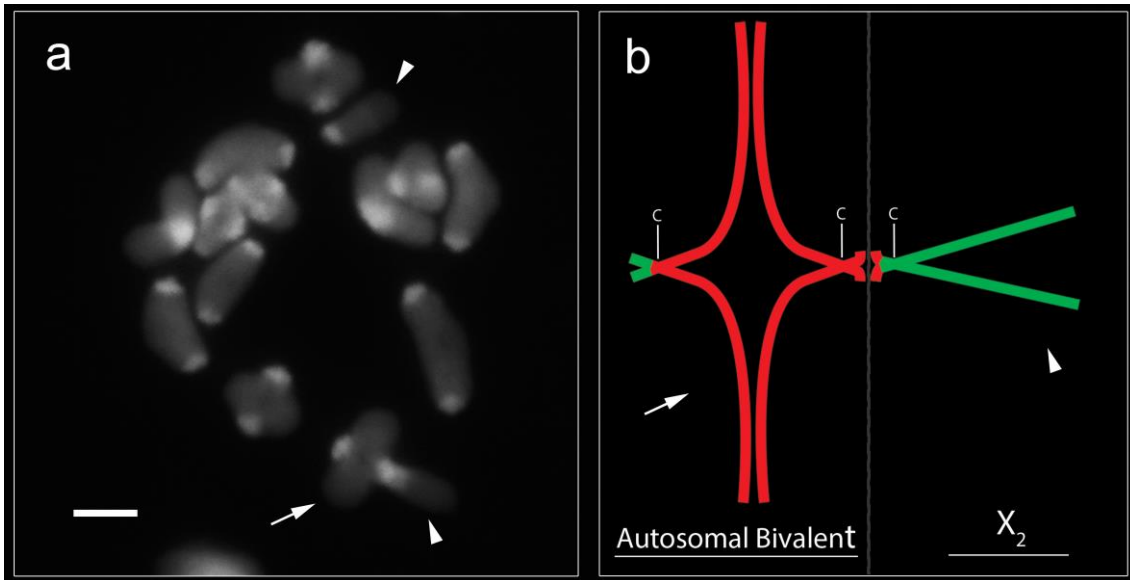
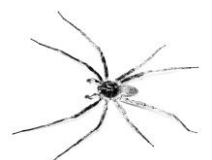


Fig. 3 Diakinesis cell of *Ctenus medius* after C-banding. **c** = centromere region. **(a)**, arrowheads show sex chromosomes and arrow show an autosomal bivalent which, in association with the X_2 sex chromosome forms the trivalent; graphical representation of trivalent formation in diakinesis, showing pairing in the region of short arm between the autosomal bivalent and the X_2 sex chromosome, suggesting a possible translocation **(b)**. Scale bar = 10 μ m.

6.3.3 - *Ctenus ornatus*

Ctenus ornatus showed $2n = 28$ ($26 + X_1X_20$) in males (Fig. 4a) and $2n = 30$ ($26 + X_1X_1X_2X_2$) in females (Fig. 4b). All chromosomes were acrocentric and the autosomal complement gradually decreasing in size. The $X_1:X_2$ size ratio obtained of meiotic cells showed that X_2 sex chromosome corresponds to 75% of the X_1 chromosome length. However, additional analyses with C-banding, evidenced the X_1 and X_2 sex chromosomes as the largest and the smallest chromosomes in the complement (Figs. 4a, b, c). In mitotic metaphase cells, secondary constrictions were observed in the terminal region of the long arm of pair 12 (Fig. 4a). FISH technique demonstrated the presence of 18S rDNA genes in the terminal region of the long arm of pair 12 (Fig. 4, box), coincident with the secondary constriction (Fig. 4a) and the presence of histone H3 genes in pairs 2, 8, 11 and 13, the last two in interstitial position (Fig. 4).



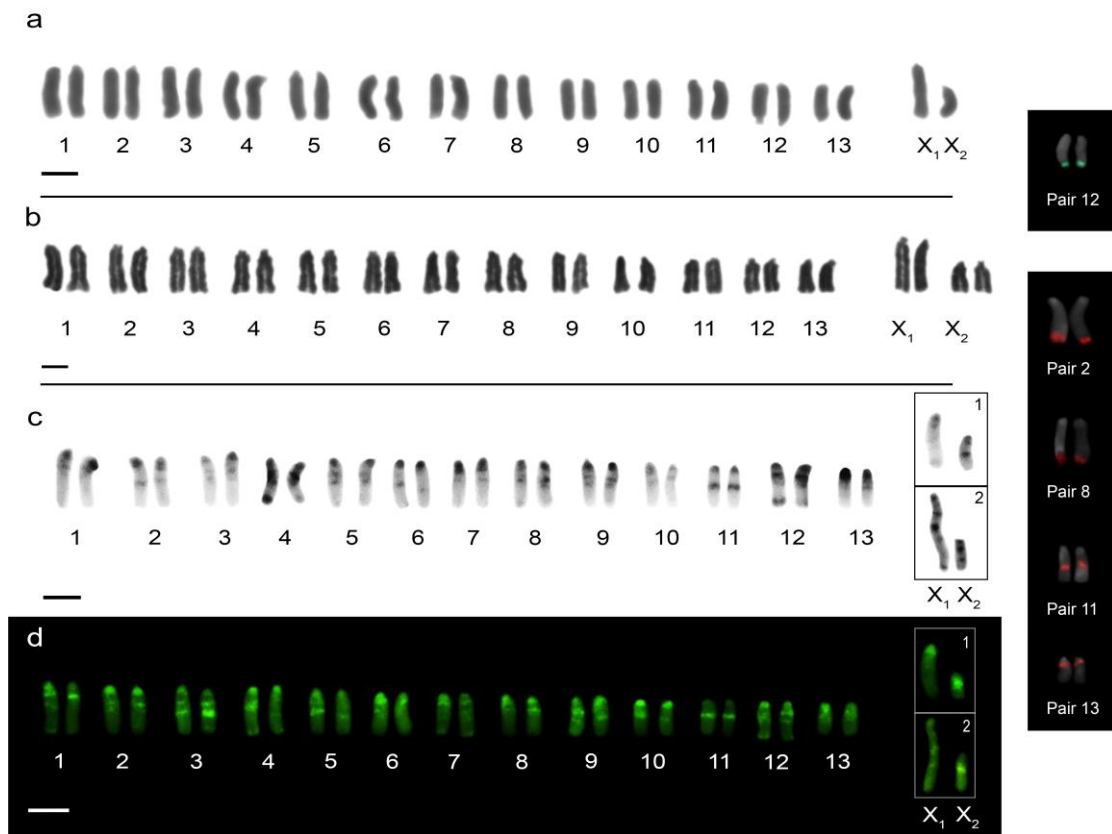
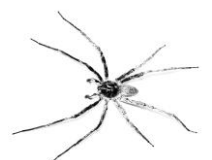


Fig. 4 Male and female karyotypes of *Ctenus ornatus* with conventional staining Giemsa (**a**, **b**, respectively); male karyotype after C-banding (**c**) and staining with fluorochrome CMA₃ (**d**), inset boxes show the sex chromosome pair of the Parque Estadual Mata dos Godoy (**c1**, **d1**) and Parque Nacional do Superagui (**c2**, **d2**): note the difference in X₁ sex chromosome banding pattern between populations. Inset box shows chromosome pairs with 18S rDNA (green) and Histone H3 (red). Scale bar = 10 μm.

C-banding technique evidenced heterochromatic blocks in the centromeric, interstitial and terminal regions of the chromosomes. However, the profile of the X₁ sex chromosome differed between the two populations (Figs. 4c, d). CMA₃ and DAPI staining showed the presence of GC-rich regions, CMA₃⁺ and DAPI⁺, coincident with the C-banding pattern (Figs. 4d, 5e–h).



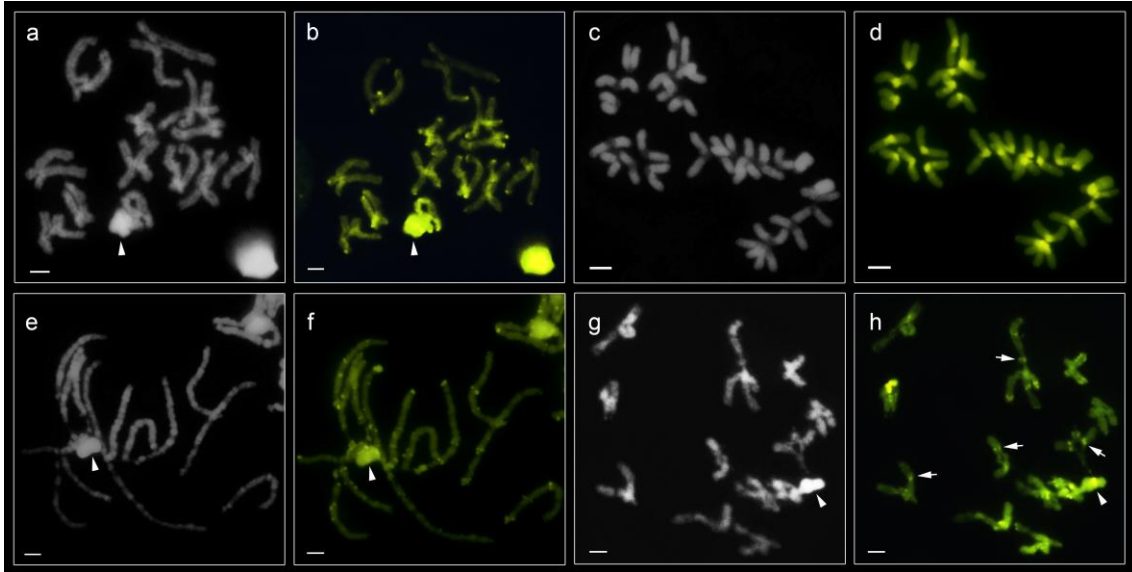
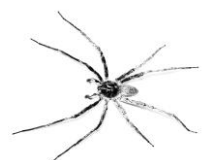


Fig. 5 Meiotic cells after staining with base-specific fluorochromes DAPI (**a, c, e, g**) and CMA3 (**b, d, f, h**). Arrowheads point sex chromosomes. Diplotene cells of *Guasuctenus longipes* (**a, b**); Metaphase II cells of *C. medius* (**c, d**); Pachytene cells (**e, f**) and diplotene cells (**g, h**) of *C. ornatus*: arrows (**h**) point to interstitial blocks. Scale bar = 10 μm .

Meiotic analyses in *C. ornatus* evidenced isopycnotic sex chromosomes in pachytene cells of females (Fig. S3a). In males, sex chromosomes showed positive heteropycnosis in the early stages of meiosis (Figs. S3b, c). Metaphases II showed cells with 13 and 15 chromosomes, confirming the X_1X_20 SCS (Fig. S3d). In the PNS population, we observed two specimens with one supernumerary chromosome (Figs. S3e–g), with approximately 50% of frequency in both specimens, and one specimen with two supernumerary chromosomes (Fig. S3h), with 53% of frequency. These chromosomes showed positive heteropycnosis (Fig. S3e) and behavior similar to the sex chromosomes (Figs. S3f, h)

An idiogram of the distribution of heterochromatin, 18S rRNA, and histone H3 genes in the karyotype of *G. longipes*, *C. medius*, and *C. ornatus* is shown in Fig. 6.



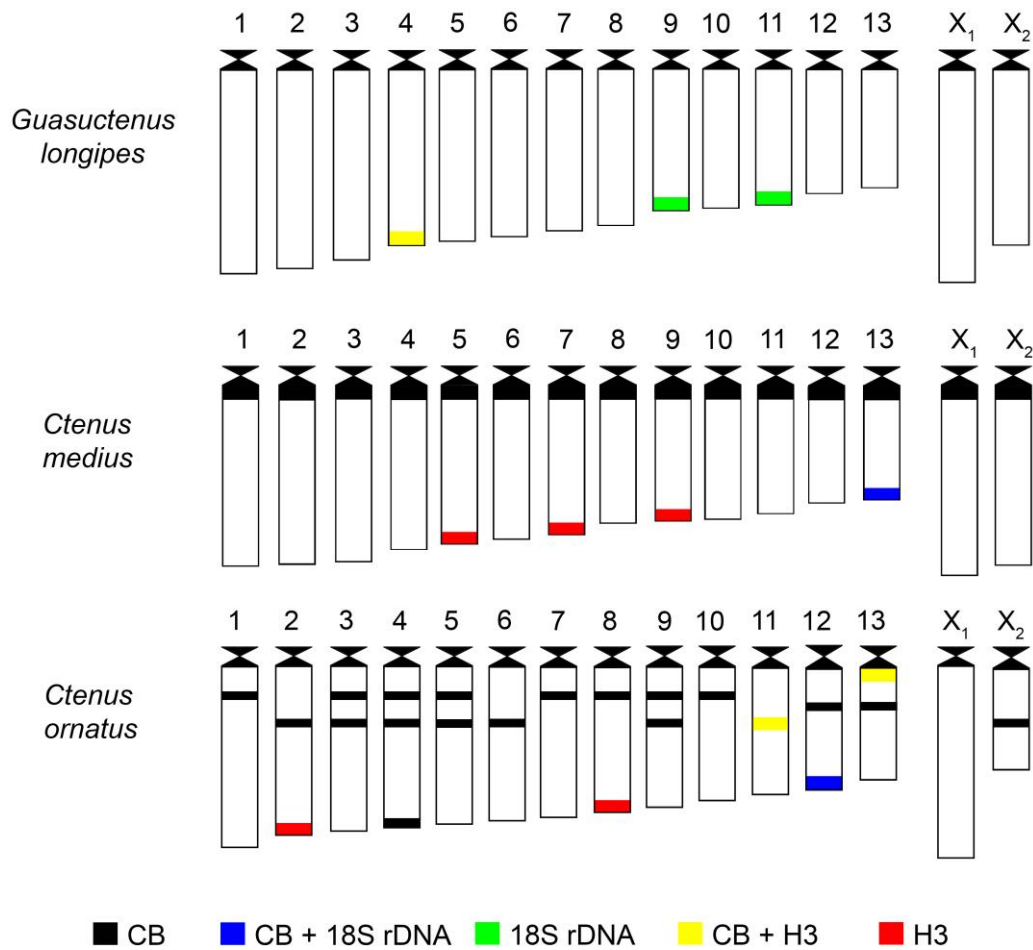
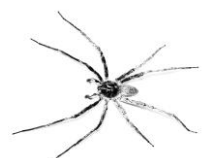


Fig. 6 Representative idiogram of *Guasuctenus longipes*, *Ctenus medius* e *C. ornatus* showing different banding: C-banding (CB), 18S DNAr and histone H3 sites and regions where the heterochromatin blocks are coincident with the 18 rDNA or histone H3 sites.

6.4 - Discussion

6.4.1 - Karyotypic analysis

The karyotypes of *Guasuctenus longipes*, first described, *Ctenus medius* and *C. ornatus* showed a conserved pattern, similar to the ancestral karyotype described for the superfamily Lycosoidea [21, 22]. This karyotype with $2n\♂ = 26 + X_1X_20$, is present in all *Ctenus* species and varies only in the size ratio of the sex chromosomes [9, 10, 11, 23]. The divergence about $X_1:X_2$ size ratio and the definition of the X_2 sex chromosome in *C. ornatus*, may be explained by higher condensation of the sex chromosomes in meiosis, Therefore, the karyotypic structure is well conserved in *Ctenus*, indicating the need to evaluate other characteristics to cytogenetically differentiate the species of the genus.

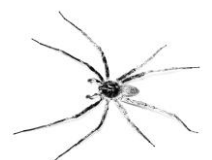


A common feature in spider karyotype is the presence of secondary constrictions [21, 22, 24], which had been described in Ctenidae only in *Nothoctenus* sp. and *Ctenus* sp. [9]. In *C. ornatus* and *G. longipes*, secondary constrictions were shown to be associated to 18S rDNA, and this type of association is recurrent in several animal groups, such as the grasshopper *Abracris flavolineata* De Geer 1773 [25] and the fish *Loricariichthys platymetopon* Isbrücker and Nijssen, 1979 [26].

Araujo et al. [9] also reported the occurrence of one supernumerary chromosome in a male specimen of *C. ornatus* with meiotic behavior of univalent chromosome similar to that in sex chromosomes. Since this system is recurrent in spiders, the authors proposed that this may be an origin event of $X_1X_2X_30$ SCS [9, 27, 28, 29]. This same event may be occurring in the cells of the analyzed specimens in this study. And the presence of two supernumerary chromosomes in other specimen may demonstrate the conversion for a $X_1X_2X_3X_40$ SCS in Ctenidae for the first time, thus occurring systems involving neo- X_3 and neo- X_4 sex chromosomes.

The occurrence of supernumerary can be considered recurrent in *C. ornatus* because the distance from the region sampled in this study to the region sampled by Araujo et al. [9] was >300 km. However, further analyses are necessary to determine the frequency of these chromosomes in different populations of this species and elucidate the mechanisms involved in its formation.

A very striking feature of the karyotype of all analyzed Lycosoidea species is the difference in the size of the sex chromosomes, which was also observed among the three species analyzed here, in the ratio of size X_1 : X_2 . This polymorphism may be the result of translocations between autosomes and sex chromosomes, as discussed earlier by Dolejš et al. [21], for Lycosidae species. Probably, the amount of heterochromatin is not necessarily involved in this polymorphism because in *C. ornatus*, despite the very evident heterochromatic bands, the sex chromosome X_2 was identified as the smallest complement chromosome. Therefore, the presence of a trivalent in a specimen of *C. medius* from PEMG,



involving the association of an autosomal bivalent with a sex chromosome, reinforces the hypothesis of Dolejš et al. [21] that translocations are one of the main mechanisms responsible for the differentiation of sex chromosomes in this superfamily.

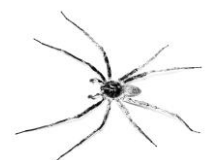
6.4.2 - Inferences about the distribution of repetitive DNA in Cteninae

Repetitive DNA sequences in the terminal regions of the chromosomes are common in Ctenidae, including heterochromatic regions and 18S rRNA genes [10, 11]. Dolejš et al. [21] suggest that NORs in the terminal region of the long arm of autosomal chromosomes constitute a plesiomorphic condition in Araneomorphae, which appears to apply to Ctenidae, even in subfamilies such as Acantheinae and Acanthotheninae [11], which have derived morphological traits [7].

Guasuctenus longipes (present study), *C. indicus* [10] and *Phoneutria nigriventer* [11] were the only species in Cteninae that demonstrated to have more than one chromosomal pair carrying 18S rDNA genes. In this respect, *C. medius* and *C. ornatus* had a similar profile, in addition to having an increase in the number of histone H3 genes and heterochromatin distribution; the latter was significant in *C. medius* owing to the size of the heterochromatic blocks and in *C. ornatus* because of the number and the distribution profile of these blocks (Fig. 6).

Results of a comparative analysis of the most recent cytogenetic and phylogenetic data for Cteninae indicated that the close relationship between *C. medius* and *C. ornatus* found in the present study and the very different karyotype profile for *Guasuctenus longipes* (previously described as *Ctenus longipes*), are well supported by the morphological analysis of Polotow and Brescovit [7], who studied 32 species of *Ctenus* and concluded that the genus was polyphyletic. These authors indicated that *C. medius* was grouped in a clade (Clade F) together with *C. ornatus*, *C. vehemens*, *C. fernandae* and *C. paubrasil*, among other species, whereas *Guasuctenus longipes* belonged to a separate clade (Clade K) and was more phylogenetically related to species of the genera *Parabatinga* and *Isoctenus*.

The presence of interstitial heterochromatin bands in *C. ornatus* may appear to be an apomorphic feature of the species, but it is not unique to it. C-banding analyses in cells of *C. medius* in pachytene indicated the presence of a few interstitial heterochromatic bands in some chromosomes but not in metaphase, probably because of their high degree of



condensation. Moreover, the colocalization of histone H3 and the heterochromatic bands, in specially the interstitial bands in *C. ornatus*, suggest a direct relationship of evolution between histone genes and heterochromatin in *Ctenus*.

Therefore, although cytogenetic data are not available for other species of the clade where *C. medius* and *C. ornatus* are grouped, it can be concluded that amplification and dispersion events of heterochromatin and repetitive DNA sequences, such as those originated by transposons and ectopic exchanges [30], were significant for the evolutionary history of the karyotypes of both species. The differences in the sex chromosome X₁ between two *C. ornatus* populations suggest that these mechanisms continue to occur. Furthermore, the presence of interstitial histone H3 sites may be evidence that paracentric inversions also played a role in karyotype differentiation in this group of spiders.

This study, besides bringing the first physical mapping data of histone H3 in spiders and the first cytogenetic description in a new genus, shows the potential of chromosomal markers in the karyotype characterization in Araneae. In addition to histone genes, heterochromatic and 18S rDNA profiles showed a similarity between *C. medius* and *C. ornatus*, and a differentiation of *Guasuctenus longipes* congruent with the morphological data.

Acknowledgments

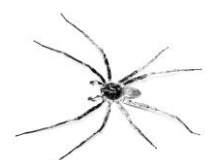
The authors thank Robson Rockembacher (UEL) for their assistance with sample collection; the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) and Instituto Ambiental do Paraná (IAP) for the assistance in the Conservation Units sampled.

Funding

This research was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance code 001, Fundação Araucária (agreement 001/2017), Fundação Grupo Boticário (agreement 013/2018), and by the CNPq (303028/2014-9 to ADB).

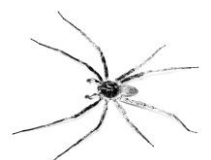
Authors' contributions

ALD, MPR designed the study; ADB identified the species and revised the text; MPR collected the samples, performed the cytogenetic analyses, figures and wrote the text. ALD critically revised the manuscript and approved the final version.



6.5 - References

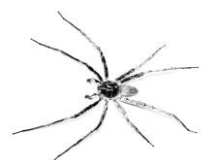
1. World Spider Catalog. World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern. 2020; online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 10/01/2020.
2. Polotow D, Carmichael A, Griswold CE. Total evidence analysis of the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae). *Invertebr Syst.* 2015; 29:124–163.
3. Wheeler WC, et al. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics.* 2017; 33:574–616.
4. Simó M, Brescovit A. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. *Bull Br Arachnol Soc.* 2001; 12: 67–82.
5. Davila DS. Higher-Level Relationships of the Spider Family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bull Am Mus Nat Hist.* 2003; 274:1–86.
6. Polotow D, Brescovit AD. Revision and cladistic analysis of *Isoctenus* and description of a new Neotropical genus (Araneae, Ctenidae, Cteninae). *Zool J Linn Soc.* 2009; 155:583–614.
7. Polotow D, Brescovit AD. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zool J Linn Soc.* 2014; 170:333–361.
8. Polotow D, Brescovit AD. *Guasuctenus* gen. nov., a new Neotropical spider genus of Ctenidae (Araneae). *Zootaxa.* 2019; 4624(4): 539-550.
9. Araujo D, et al. Comparative Cytogenetics of Seven Ctenidae Species (Araneae). *Zool Sci.* 2014; 31:83–88.
10. Kumar SA, Venu G, Jayaprakash G, Venkatachalaiah G. Studies on chromosomal characteristics of *Ctenus indicus* (Gravely 1931) (Araneae: Ctenidae). *Nucleus.* 2017; 60:17–23.
11. Rincão MP, Chavari JL, Brescovit AD, Dias AL. Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): Detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comp Cytogenet.* 2017; 11:627–639.
12. Araujo D, Rheims CA, Brescovit AD, Cella DM. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *J Zool Syst Evol Res.* 2008; 46:89–95.
13. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52:201–220.
14. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972; 75:304–306.



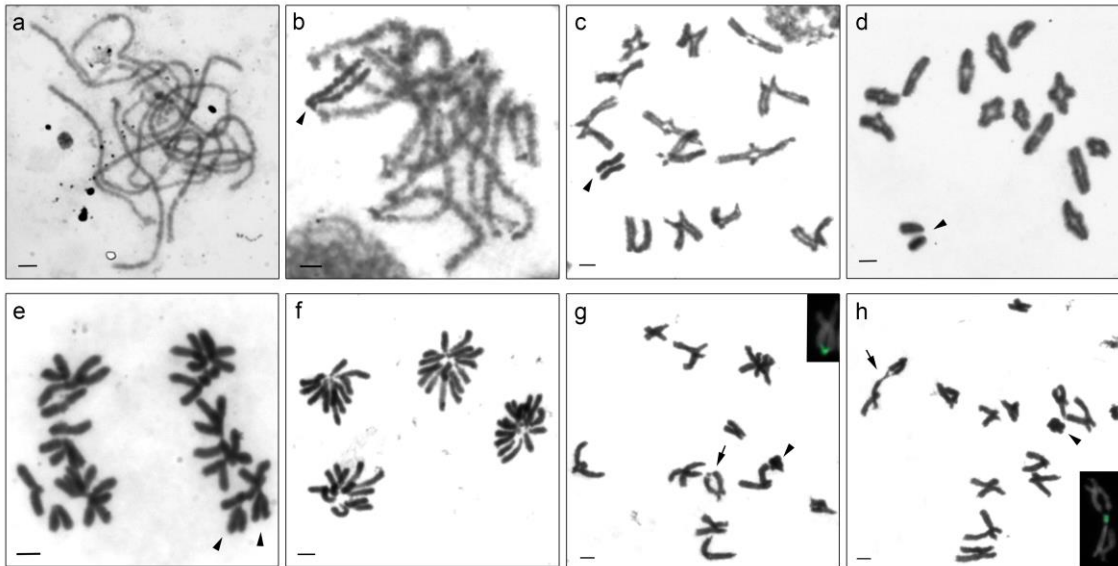
15. Lui, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*. 2012; 87 (7), p. 433-438.
16. Schweizer D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 1980; 27:190–193.
17. Reeves, A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*. 2001; 44(3), 439-443.
18. Schwarzscher T, Heslop-Harrison JS. *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers, Oxford. 2000.
19. Colgan DJ, et al. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust J Zool*. 1998; 46:419–437.
20. Hall T. BioEdit v7.2.5: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 2013; Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Accessed 15 October 2018.
21. Dolejš P, et al. Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *Eur J Entomol*. 2011; 108:1–16.
22. Araujo D, et al. Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. *J Arachnol*. 2015; 43:174–181.
23. Chen SH. Cytological Studies on Six Species of Spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, and Ctenidae). *Zool Stud*. 1999; 38:423–434
24. Král J, et al. Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biol J Linn Soc*. 2013; 109, 377–408.
25. Pine MB, et al. Chromosome mapping in *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) (Orthoptera) from the Iguaçu National Park – Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Comp Cytogenet*. 2017; 11(2):203-212.
26. Takagui FH, et al. The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic Diversification of the Species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. *Zebrafish*. 2014; 11:300–305.
27. Král J. Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. *Chromosome Res*. 2007; 15:863–879.
28. Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. Sex Chromosomes and Meiosis in Spiders: A Review. In: Swan A (ed) *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. 2012; 87–108.



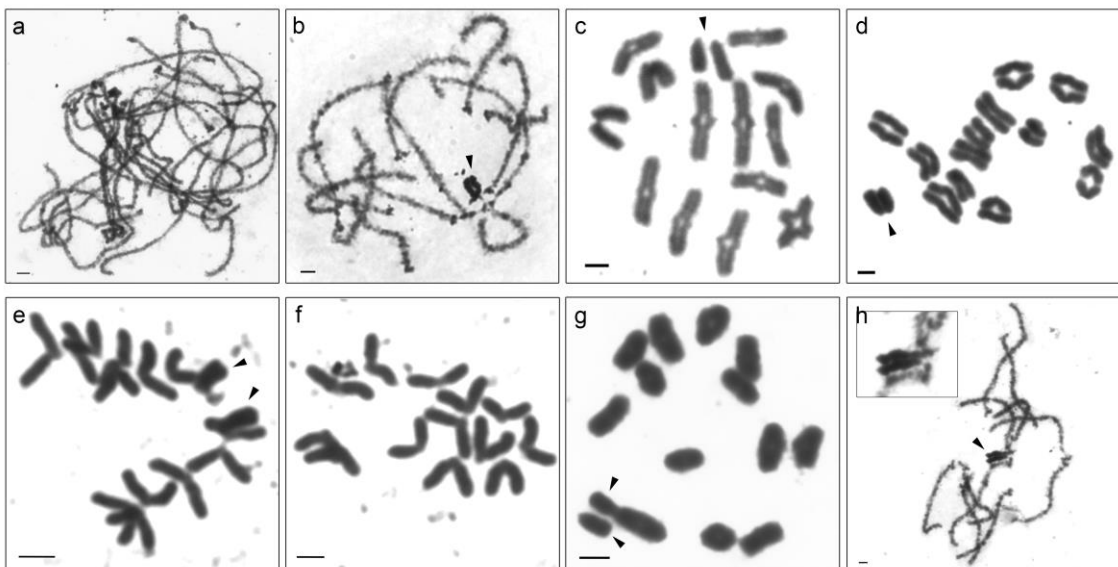
29. Kořínková T, Král J. Karyotypes, Sex Chromosomes, and Meiotic Division in Spiders. In: Nentwig W (ed) Spider Ecophysiology. 2013; 159–171.
30. Schweizer D, Loidl J. A model for heterochromatin dispersion and evolution of C-band patterns. In: Stahl A, Luciani JM, Vagner-Capodano AM (eds) Chromosomes today 9. Allen and Unwin, London. 1987; 61-74.



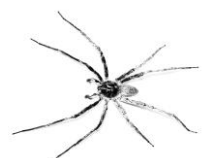
6.6 - Anexos

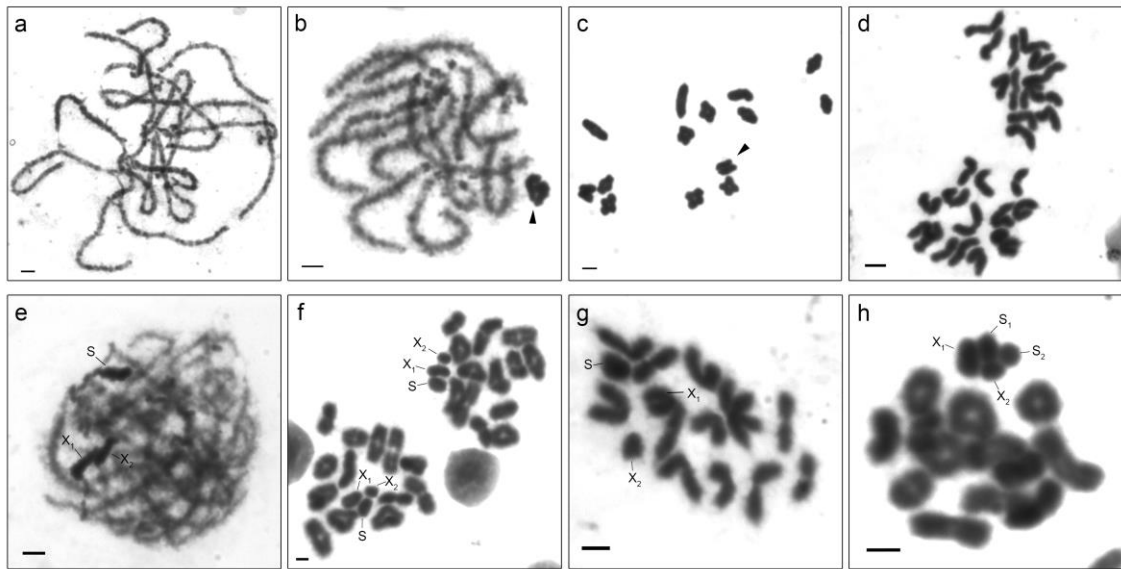


Additional File 2: Fig. S1 Female (a) and male (b-h) meiotic cells of *G. longipes* with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diplotene (c); diakinesis (d); metaphase II (e); anaphase II (f); diplotene (g, h); arrows show associated satellites between homologous (g) and non-homologous chromosomes (h) in all individuals of the Parque Nacional do Superagui population coinciding with 18S rDNA sites (boxes).

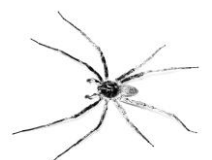


Additional File 3: Fig. S2 Female (a) and male (b-h) meiotic cells of *C. medius* with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diakinesis cell (c); metaphase I cell (d); metaphases II cells, with 15 and 13 chromosomes (e, f, respectively); diakinesis (g) and pachytene cells (h), showing the trivalent observed in the individual of Parque Estadual Mata dos Godoy.



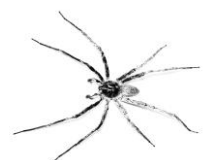


Additional File 4: Fig. S3 Female (a) and male (b-h) meiotic cells of *C. ornatus* with conventional staining Giemsa. Arrowheads point sex chromosomes. Pachytene cells (a, b); diakinesis cell (c); metaphases II cells; pachytene, diakinesis and metaphases II cells (e, f, g, respectively, showing one supernumerary chromosome (S), totally heteropicnotic (e); diakinesis cell evidencing two supernumerary chromosomes (S₁ and S₂) with similar behavior to sex chromosomes.



Additional File 1: Table S1. Specimens separated by collection sites. PNS = Parque Nacional de Superagui, Guaraqueçaba-PR; PEMG = Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina-PR. The numbers determine specimen voucher deposited in the arachnological collection of the Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curator AD Brescovit), São Paulo/SP, Brazil.

<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891		<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)		<i>Guasuctenus longipes</i> Polotow e Brescovit, 2019	
PEMG	PNS	PEMG	PNS	PEMG	PNS
215931	217942	215932	215943	215885	215926
215936	217943	217937	215944	215916	215937
217920	215942	217938	215939	215916	215923
217927	217931	217939	217936		215945
217925	217930	217940	217935		215935
217922	217934	217941	217933		215934
217924	215891	217926	215910		215930
217954	215925	217944	216074		215866
217955	215892	217945	216103		216116
217957	217932	217946			216105
	217921	217948			216086
	217759	217950			214465
	216084	217958			216117
	216083	217879			217761
	217756	217879			
	216119	217915			
		217916			
		217917			



7 - CAPÍTULO 2

Primeira descrição citogenética em *Isoctenus* Bertkau, 1880 (Araneae, Ctenidae): caracterização do cariótipo ancestral do gênero.

Este artigo será submetido para publicação na Chromosome Research.



Primeira descrição citogenética em *Isoctenus* Bertkau, 1880 (Araneae, Ctenidae): caracterização do cariótipo ancestral do gênero.

Running title: Primeiro dados citogenéticos em *Isoctenus*

Matheus Pires Rincão¹, Antonio Domingos Brescovit², Ana Lúcia Dias¹

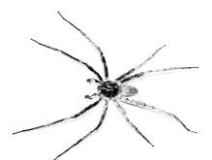
¹Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Londrina, Brasil. ²Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Matheus P. Rincão – Autor correspondente (rincaom@gmail.com)

Resumo:

Dentre os 48 gêneros de Ctenidae, *Isoctenus* se caracteriza por ser um dos gêneros endêmicos do continente sul-americano, abrangendo 16 espécies, das quais pelo menos 15 ocorrem no Brasil. Apesar disso, não há nenhuma informação citogenética disponível na literatura sobre esse gênero, de modo que o presente estudo teve o intuito de caracterizar citogeneticamente seis espécies de *Isoctenus*, *I. corymbus*, *I. coxalis*, *I. herteli*, *I. janeirus*, *I. ordinario* e *I. strandi*, determinando a distribuição da heterocromatina, DNAr 18S e histona H3. Todas as seis espécies apresentaram $2n_{\text{♂}}=28$ (26 + X₁X₂0), evidenciando um número diploide conservado no gênero, com cromossomos predominantemente acrocêntricos/telocêntricos, contudo foram observados cromossomos subtelocêntricos em *I. janeirus*, *I. strandi* e em *I. ordinario*. Em todas as espécies os cromossomos sexuais X₁ e X₂ foram identificados como sendo o maior e o menor elementos respectivamente, exceto em *I. corymbus*, onde não foi possível identificar os sexuais. O bandeamento C evidenciou heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas das quatro espécies analisadas. Além disso, a FISH mostrou marcações múltiplas de DNAr 18S apenas para *I. ordinario*, espécie basal na filogenia do gênero, sugerindo que, até o momento, esta seja uma característica ancestral em *Isoctenus*.

Palavras chave: Citogenética de Aranhas; DNAr 18S; Histona H3; FISH



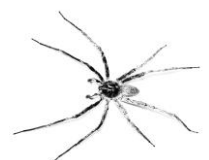
7.1 - Introdução

Descrito por Bertkau em 1880, *Isoctenus* é composto por aranhas endêmicas da América do Sul (Polotow e Brescovit, 2019a), contando atualmente com 16 espécies, das quais, pelo menos 15 ocorrem no Brasil (World Spider Catalog, 2020). São aranhas errantes e de hábitos noturnos, de médio a grande porte, e que pertencem à Ctenidae (Polotow e Brescovit, 2019a). Recentemente, foram incluídas na subfamília Cteninae por Polotow e Brescovit (2014), agrupadas próximo de *Parabatinga* Polotow e Brescovit 2009 e do gênero recém descrito *Guasuctenus* Polotow e Brescovit (2019b).

Citogeneticamente, o gênero ainda permanece desconhecido contudo, tanto *Parabatinga*, gênero monoespecífico, quanto *Guasuctenus* já apresentam alguma descrição cariotípica. Araujo et al. (2014) fizeram a primeira descrição do número diploide para *Parabatinga brevipes* Polotow e Brescovit (2009) e Rincão et al. (enviado para publicação) para *Guasuctenus longipes* Polotow e Brescovit (2019b), evidenciando 28 cromossomos nos machos com sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo X_1X_20 , e cromossomos exclusivamente acrocêntricos/telocêntricos, para ambas as espécies.

Dolejš et al. (2011) propõe que o cariótipo ancestral para Lycosoidea, onde está inserida Ctenidae (Wheeler et al., 2016), seja de $2n♂=28$ ($26 + X_1X_20$), hipótese reforçada por Araujo et al. (2015). Contudo, o baixo número de espécies analisadas citogeneticamente em Ctenidae torna difícil determinar com precisão qual seu cariótipo ancestral, uma vez que a subfamília considerada basal na filogenia, Acanthocteninae (Polotow e Brascovit, 2014) apresenta, até o momento, apenas espécies com $2n♂=29$ ($26 + X_1X_2X_30$) e que a conversão do SCS pode atuar em ambas as direções, X_1X_20 para $X_1X_2X_30$, ou vice-versa (Araujo et al., 2012). Além disso, Ctenidae possui um cariótipo conservado em relação à morfologia cromossômica (Araujo et al., 2020), o que dificulta a investigação sobre os eventos evolutivos, como rearranjos cromossômicos, que podem ter atuado na diversificação cariotípica desses animais.

Frente ao fato de que em muitas famílias de aranhas a fórmula cariotípica e o número diploide são conservados, é evidente a necessidade de aumentar o número de caracteres que auxiliem na diferenciação dos cariótipos. Nesse sentido, as sequências de DNA moderadamente repetitivas, compostas pelas famílias multigênicas, fornecem marcadores citogenéticos capazes de evidenciar rearranjos cromossômicos e eventos de dispersão de



sequências repetitivas (Cabral-de-Mello et al., 2011a). Até o momento, pelo menos 24 famílias de aranhas, abrangendo as duas infraordens dentro de Opisthothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae, possuem algum dado sobre mapeamento de DNA repetitivo, uma vez que o emprego da técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) na citogenética de aranhas ainda é muito recente, e somente em 2013 as primeiras espécies de aranha tiveram os genes de DNAr 18S mapeados, *Brachypelma albopilosum* Valerio, 1980, em Theraphosidae, com RONS simples (Král et al. 2013), e *Wadicosa fidelis* (O. Pickard-Cambridge, 1872), em Lycosidae, com marcações múltiplas e variação intraespecífica no número de cromossomos portadores dos sítios de 18S (Forman et al. 2013).

Somente em 2017, Rincão et al. (2017) descreveram os primeiros dados de FISH para Ctenidae, utilizando sondas de DNAr 18S, em cinco espécies de Ctenidae, evidenciando regiões organizadoras de nucléolo (RONS) simples em *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877), *C. medius* Keyserling, 1891, *V. andicola* (Simon, 1906) e *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880), e RONS múltiplas, em três pares cromossômicos em *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). Mais recente Rincão et al. (enviado para publicação) fizeram a primeira descrição do uso de sondas de histona H3 em aranhas, revelando padrões espécie-específicos de distribuição dos genes de histona H3 em *C. ornatus*, *C. medius* e em *G. longipes*.

Apesar da evidente lacuna no número de espécies com descrição citogenética em Ctenidae, e do emprego de outras metodologias que auxiliem na caracterização dos cariótipos dentro da família, nossos dados forneceram um importante subsídio para compreender as relações evolutivas entre os cariótipos do clado que abriga *Guasuctenus*, *Parabatinga* e *Isoctenus*. Além disso, realizar a caracterização cariotípica para seis das 16 espécies de *Isoctenus* descritas atualmente, e identificar os perfis de distribuição dos sítios de DNAr18S e histona H3, contribuindo significativamente com a citogenética da família.

7.2 - Material e Métodos

Foram coletados ao todo 78 indivíduos de *Isoctenus*, entre juvenis e adultos, distribuídos nas seis espécies analisadas no presente estudo, em 4 Unidades de Conservação localizadas no estado do Paraná, Brasil, como mostra a **Tabela 1**. Os espécimes foram depositados na coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSP, Curador: AD Brescovit), São Paulo/SP, Brasil.

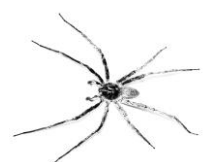
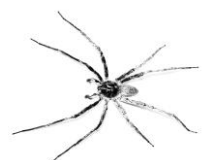


Tabela 1: Lista de espécies analisadas, distribuídas por sexo e locais de coleta. PARNA = Parque Nacional.

Espécie	Amostra		Local de Coleta
	♂	♀	
<i>I. corymbus</i> Polotow, Brescovit e Pellegatti-Franco, 2005	2	4	PARNA de Saint-Hilaire/Lange Matinhos-PR W 48° 33' 47,50", S 25° 48' 42,30"
<i>I. coxalis</i> (F. O. Pickard-Cambridge, 1902)	6	1	PARNA de Superagui Guaraqueçaba-PR W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
	1	1	PARNA de Saint-Hilaire/Lange
	2	4	Parque Estadual de Vila Velha Ponta Grossa-PR
	3	5	Parque Estadual do Guartelá Tibagi-PR
<i>I. herteli</i> (Mello-Leitão, 1947)	12	1	Parque Estadual de Vila Velha W 50° 00' 11,30", S 25° 15' 15,40"
<i>I. janeirus</i> (Walckenaer, 1837)	3	2	PARNA de Superagui
	5		PARNA de Saint-Hilaire/Lange
<i>I. ordinario</i> Polotow e Brescovit, 2009	4	1	PARNA de Foz do Iguaçu Foz do Iguaçu-PR W 54° 28' 35,40", S 25° 37' 34,00"
	4	7	Parque Estadual Mata dos Godoy Londrina-PR W 51° 14' 31,86", S 23° 26' 29,37"
<i>I. strandi</i> Mello-Leitão, 1936	4		PARNA de Superagui
	4	2	PARNA de Saint-Hilaire/Lange

As preparações cromossômicas seguiram o descrito por Araujo et al. (2008), com as modificações descritas por Rincão et al. (2017). Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964). O bandeamento C foi feito como proposto por Sumner (1972), e as lâminas foram coradas com iodeto de propídio (Lui et al. 2012)

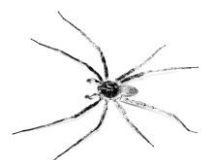


A FISH foi realizada segundo Schwarzacher and Heslop-Harrison (2000). As sondas de DNAr 18S utilizadas foram as obtidas por Rincão et al. (2017) marcadas com o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) e detectada com Avidin-FITC (Invitrogen). As sondas de histona H3 utilizadas foram obtidas por Rincão et al. (enviado para publicação) e marcadas com Cy3 dUTP (GE Healthcare) por PCR, utilizando o par de primers M13.

As lâminas foram observadas no microscópio de epifluorescência Leica DM 2000, equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens foram capturadas com auxílio do programa Motic Images Advanced, versão 3.2. Foram observadas 30 células, incluindo mitose e meiose, para se determinar o número diploide das espécies e morfologia cromossômica. Para montagem dos cariótipos foram analisadas 10 metáfases mitóticas, quando disponíveis.

7.3 - Resultados

As fêmeas de *Isoctenus corymbus* apresentaram $2n=30$, sem identificação dos cromossomos sexuais (**Fig. 1a**), não sendo possível montar o cariótipo para os machos, devido à dificuldade na obtenção de metáfases mitóticas em gônadas. A análise dos cariótipos das demais espécies revelou $2n=28$ ($26 + X_1X_20$) nos machos e $2n=30$ ($26 + X_1X_1X_2X_2$) nas fêmeas: *I. coxalis* (**Fig. 1b**), *I. herteli* (**Fig. 1c**), *I. janeirus* (**Fig. 1d**), *I. ordinario* (**Fig. 1e**) e *I. strandi* (**Fig. 1f**); X_1 e X_2 corresponderam ao maior e o menor cromossomos dos cariótipos, respectivamente. Em todas as espécies, os cromossomos apresentaram morfologia predominantemente acrocêntrica/telocêntrica, exceto para os pares 2, 4 e 12 em *I. janeirus*, para X_2 em *I. ordinario* e para os pares 5 e 11 em *I. strandi*, que apresentaram morfologia subtelocêntrica.



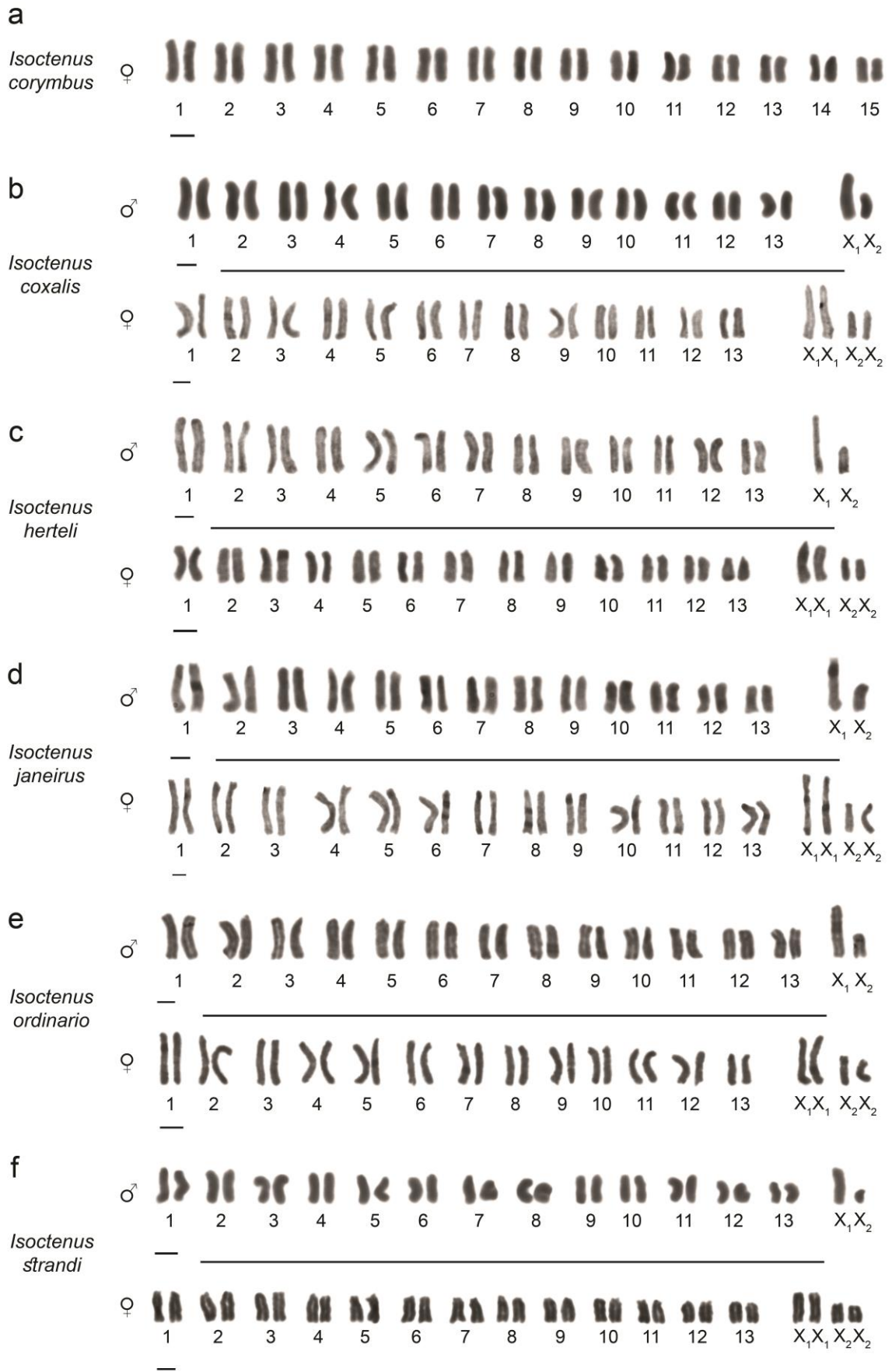
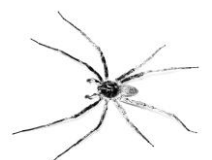


Figura 1: Cariótipos de metáfases mitóticas de *Isoctenus*. **a** *I. corymbus* (♀). **b** *I. coxalis* (♂ e ♀). **c** *I. herteli* (♂ e ♀). **d** *I. janeirus* (♂ e ♀). **e** *I. ordinario* (♂ e ♀). **f** *I. strandi* (♂ e ♀). Barra de escala = 10 µm.

As células em meiose permitiram confirmar os SCS em todas espécies (Fig. 2), inclusive em *I. corymbus*, uma vez que os cromossomos sexuais apresentaram comportamento diferenciado nos machos: heteropicnose positiva nas fases de paquíteno (**Fig. 2a, d, g, k, n, q**); comportamento de univalente com pareamento em paralelo entre os sexuais nas fases de diplóteno (**Fig. 2b, e, h, l, o**) e metáfase I (**Fig. 2r**); e migração conjunta dos sexuais para a mesma célula filha durante a primeira divisão celular, como observado nas células em metáfase II, que apresentaram 13 ou 15 cromossomos (13 autossomos + X_1X_2) (**Fig. 2c, f, i, m, p, s**). Os paquítenos de fêmeas não apresentaram cromossomos com coloração diferenciada (dados não mostrados).



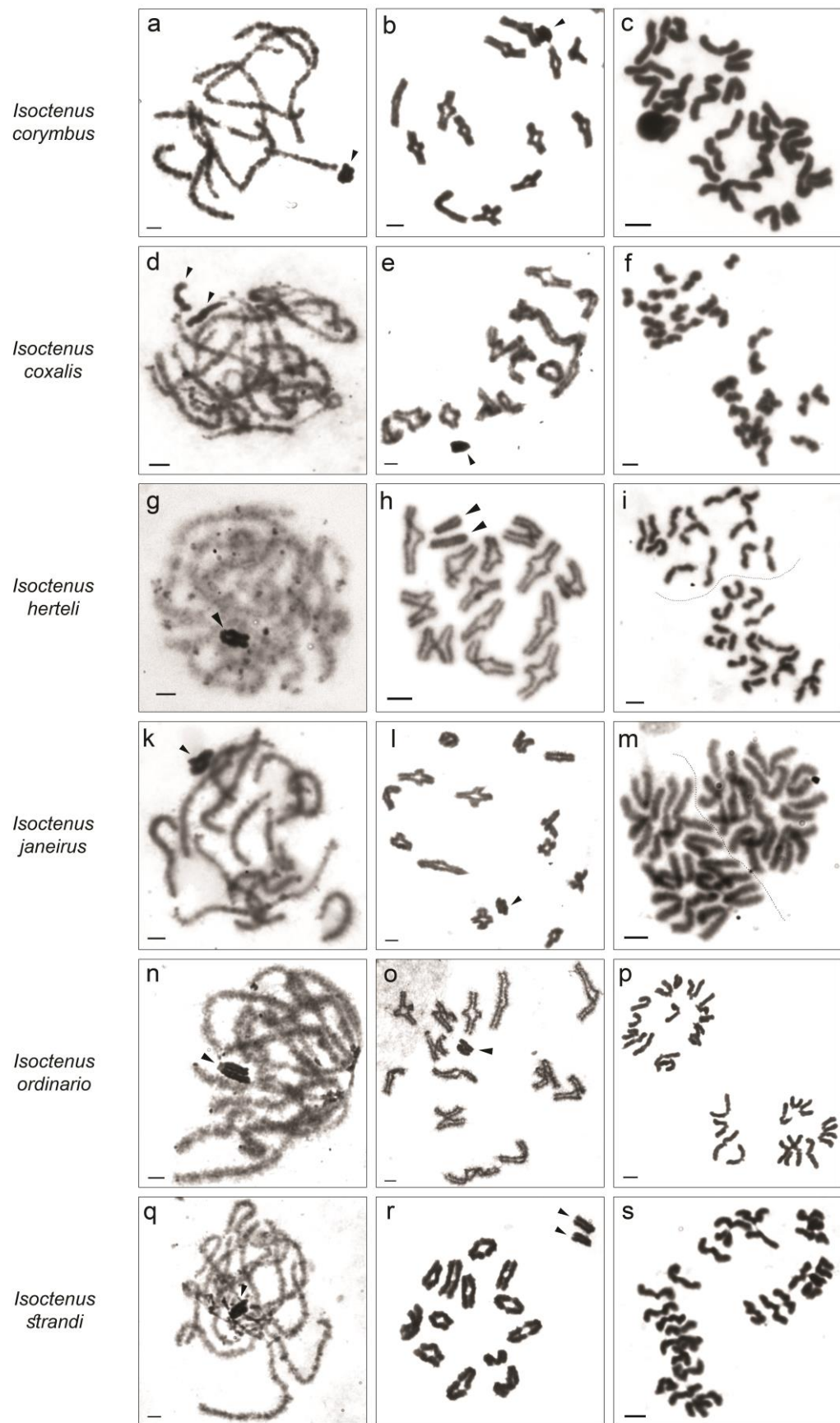
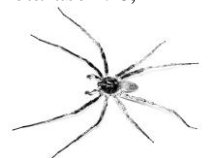


Figura 2: Células meióticas de machos de *Isoctenus*. a – c *I. corymbus*. d – f *I. coxalis*. g – i *I. herteli*. k – m *I. janeirus*. n – p *I. ordinario*, q – s *I. strandi*. a, d, g, k, np, q paquítenos. b, e, h, l, o diplótenos e r metafase I. c,



f, i, m, p, s células em metáfase II. As cabeças de seta mostram os cromossomos sexuais. Barra de escala = 10 μm .

O bandeamento C permitiu evidenciar blocos de heterocromatina constitutiva restrita à região pericentromérica da maior parte dos cromossomos em *I. coxalis* (**Fig. 3a**), *I. herteli* (**Fig. 3b**), *I. janeirus* (**Fig. 3c**) e *I. ordinario* (**Fig. 3d**). Nas demais espécies não foram obtidos dados de bandeamento C.

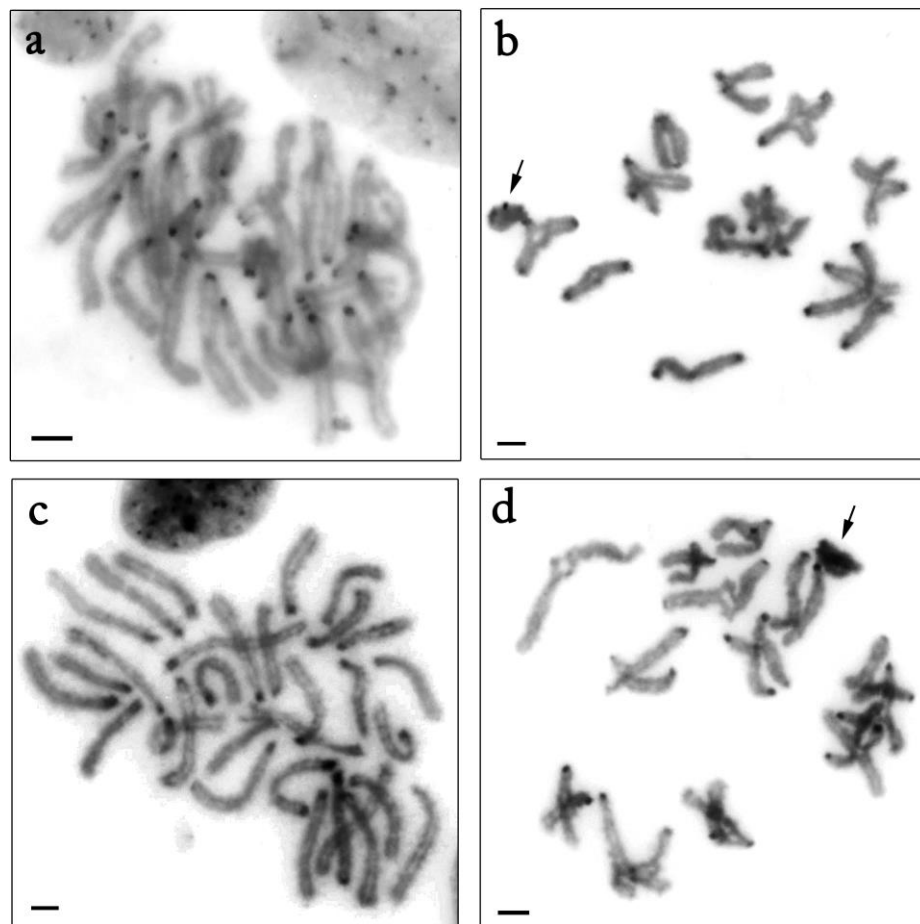


Figura 3: Células mitóticas e meióticas de *Isoctenus* submetidas ao bandeamento C. **a** metáfase mitótica de *I. coxalis*. **b** diplóteno de *I. herteli*. **c** metáfase mitótica de *I. janeirus*. **d** diplóteno de *I. ordinario*. As setas em **b**, **d** mostram os cromossomos sexuais. Barra de escala = 10 μm .

A FISH evidenciou sítios de histona H3 e DNAr 18S, respectivamente, nos pares 6 e 9 em *I. coxalis* (**Fig. 4a**) e nos pares 6 e 1 em *I. herteli* (**Fig. 4b, c**). Além disso, mostrou RONS simples em *I. janeirus* (**Fig. 4d**) e *I. strandi* (**Fig. 4e, f**); e múltiplas, em dois bivalentes, em *I. ordinario* (**Fig. 4g**). *I. janeirus* (**Fig. 4d**), *I. strandi* (**Fig. 4f**) e *I. ordinario* (**Fig. 4g**) apresentaram apenas um bivalente portador dos sítios de histona H3.



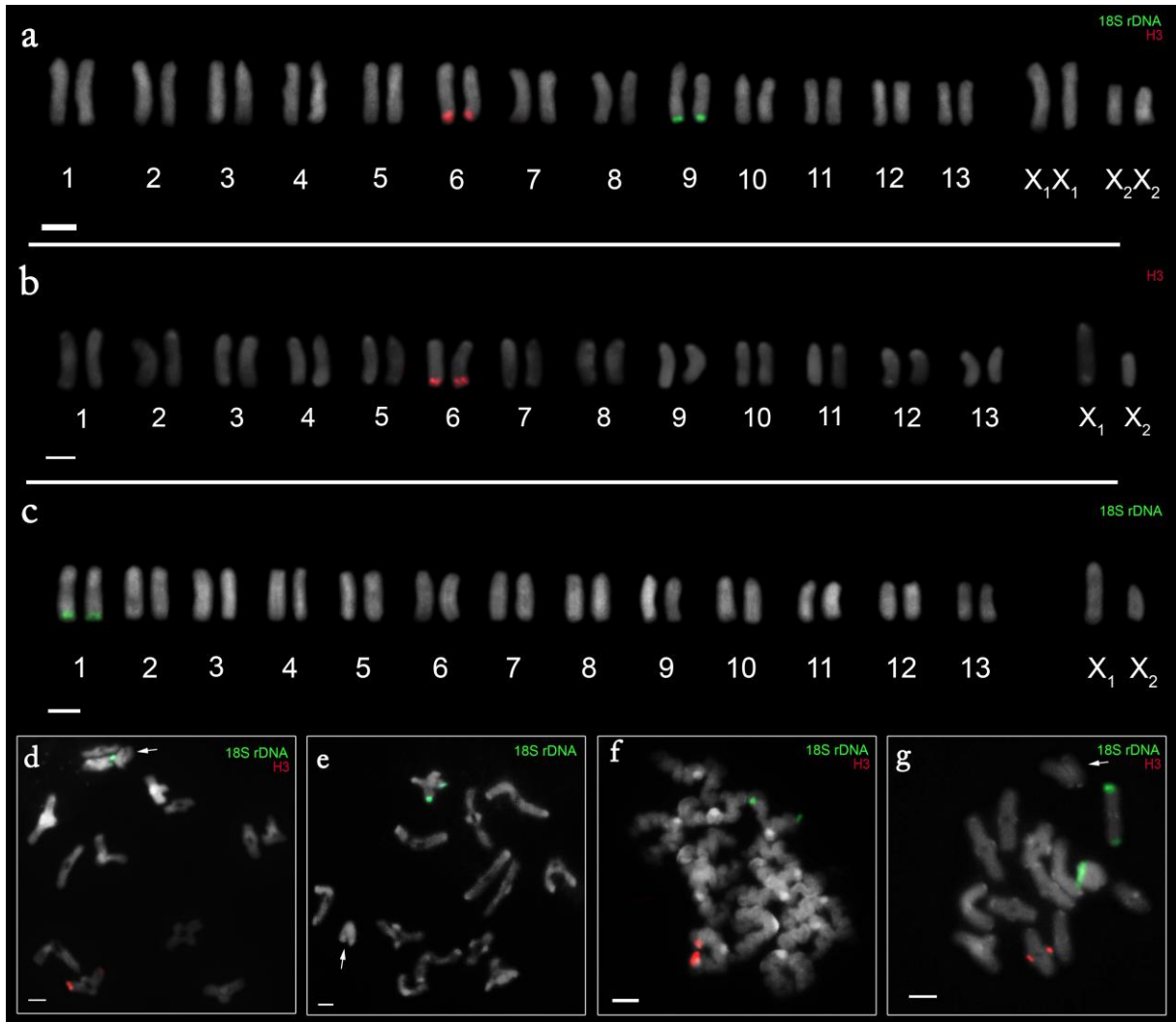
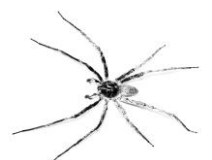


Figura 4: Células mitóticas e meióticas de *Isoctenus* submetidas à FISH. As setas apontam os cromossomos sexuais nas células em meiose. **a** *I. coxalis*. **b-c** *I. herteli*. **d** diacinese de *I. janeirus*. **e** diplóteno e **f** metáfases II de *I. strandi*. **g** diacinese de *I. ordinario*. Barra de escala = 10 μ m.

7.4 - Discussão

7.4.1 - Número diploide, estrutura cariotípica, e SCS em *Isoctenus*

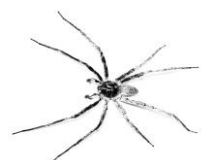
Dentre os 48 gêneros em Ctenidae (World Spider Catalog, 2020), apenas nove possuem algum dado citogenético (**Tabela 1**), sendo eles *Anahita* Karsch, 1879, *Asthenoctenus* Simon, 1897, *Ctenus* Walckenaer, 1805, *Enoploctenus* Simon, 1897, *Nothroctenus* Badcock 1932, *Parabatinga*, *Phoneutria* Perty, 1833, *Viracucha* Lehtinen, 1967 (Araujo et al., 2019) e *Guasuctenus* (Rincão et al. enviado para publicação). O presente



estudo trouxe os primeiros dados citogenéticos para *Isoctenus*, evidenciando um número diploide de $2n♂=28$ ($26 + X_1X_20$), observado em todas as seis espécies aqui analisadas.

O gênero apresentou um SCS, do tipo X_1X_20 , conservado, similar ao sistema considerado ancestral em Lycosoidea, proposto por Dolejš et al. (2011), do qual os demais sistemas derivariam dentro do grupo, por meio de uma série de eventos evolutivos (para revisão ver Araujo et al., 2012). Além disso, o número diploide observado em todas as espécies também é o mais frequente na família, embora não possa ser considerado como sendo o perfil ancestral do grupo, visto que Acanthoeteninae, a subfamília basal na filogenia de Ctenidae (Polotow e Brescovit, 2014), apresenta $2n♂=29$ ($26 + X_1X_2X_30$) nas duas únicas espécies estudadas até o momento, *Nothroctenus* sp. e *Viracucha andicola* (Araujo et al., 2014).

Apesar disso, o clado que abriga as espécies de *Isoctenus*, segundo a filogenia de Polotow e Brescovit (2014), se mostrou bastante conservado quanto ao número diploide e formula cariotípica (**Fig. 5**), uma vez que os três gêneros que possuem dados citogenéticos, *Isoctenus*, *Guasuctenus* e *Parabatinga*, apresentaram 28 cromossomos, predominantemente acrocêntricos/telocêntricos, com SCS do tipo X_1X_20 , o que sugere que este também venha a ser o cariótipo ancestral para esse clado, e, portanto, para *Isoctenus*. Apesar disso, a ocorrência de cromossomos subtelocêntricos em *I. janeirus*, *I. ordinario* e *I. strandi*, além de evidenciar um marcador espécie-específico, sugere que eventos envolvendo rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas, podem ter atuado durante a diversificação cariotípica dentro do gênero, uma vez que apenas a morfologia cromossômica, e não o número diploide, foi alterada, envolvendo tanto autossomos, em *I. janeirus* e *I. strandi*, quanto os sexuais, tal como evidenciado para *I. ordinario*.



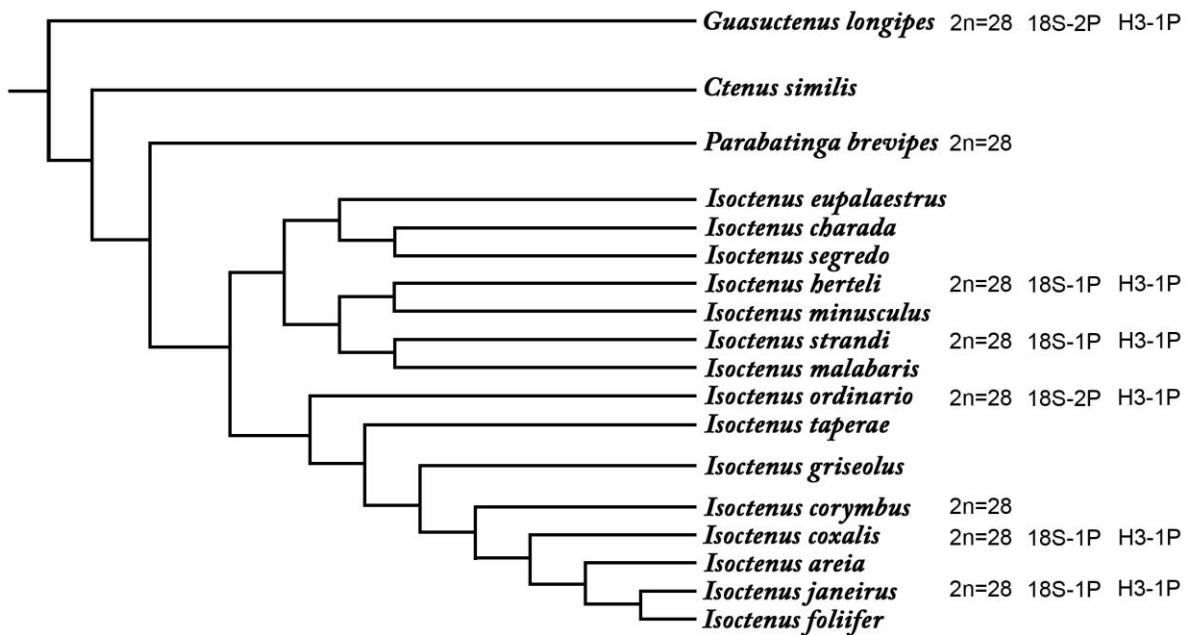
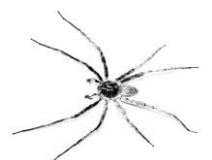


Figura 5: Cladograma das espécies de *Isoctenus*, modificado a partir de Polotow e Brescovit (2009), em conjunto com os dados do clado K, descrito por Polotow e Brescovit (2014), mostrando o número diploide das espécies analisadas no presente estudo e o número de pares cromossômicos portadores de DNAr 18S e Histona H3. 1P = um par cromossômico portador da sequência; 2P = dois pares cromossômicos portadores da sequência.

Outra característica que se mostrou bastante conservada no gênero, foi a diferença de tamanho observada entre os cromossomos sexuais e os demais cromossomos do cariótipo, sendo o maior e o menor cromossomos do complemento, exceto para *I. corymbus*, onde não foi possível identificar os sexuais no cariótipo. De acordo com Araujo et al. (2015), algumas famílias dentro de Lycosoidea apresentam diferentes perfis em relação à diferença de tamanho entre os cromossomos sexuais, e entre os cromossomos sexuais e os demais cromossomos do cariótipo, para as espécies que apresentam SCS do tipo X_1X_20 .

Considerando a filogenia molecular proposta por Wheeler et al. (2016), que agrupa sete famílias em Lycosoidea, é possível observar que, em Oxyopidae, os sexuais X_1 e X_2 correspondem a dois cromossomos de tamanho médio (Stávale et al., 2011), enquanto em *Australomisidia sociallis* (Main, 1988), citada como *Diaea sociallis*, pertencente à Thomisidae, eles representam os menores cromossomos do cariótipo (Rowell e Main, 1992). Para a maior parte das espécies de Lycosidae analisadas, os cromossomos sexuais no X_1X_20 , representam os dois maiores cromossomos do complemento, já em Trechaleidae e Ctenidae, eles são geralmente o maior e o menor cromossomo, respectivamente (Araujo et al., 2015).



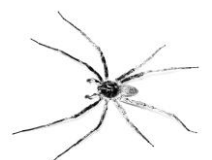
Psechridae e Pisauridae não apresentam dados em relação ao tamanho dos cromossomos sexuais.

Contudo, três das últimas espécies descritas citogeneticamente em Ctenidae, apresentaram perfis diferentes: em *Ctenus indicus* Gravely, 1931 (Kumar et al., 2017) os cromossomos sexuais se mostraram representados por dois cromossomos pequenos enquanto que, em *C. medius* (Rincão et al., 2017) e *Guasuctenus longipes* (Rincão et al., enviado para publicação), os cromossomos X₁ e X₂ foram identificados como sendo um cromossomo grande e um médio, respectivamente. Em suma, embora o baixo número de espécies analisadas possa estar mascarando a diversidade cariotípica em *Isoctenus*, nossos dados apontam para um cariótipo ancestral de $2n♂=28 (26 + X_1X_20)$, composto por cromossomos acrocêntricos/telocêntricos, e cromossomos sexuais X₁ e X₂ correspondendo ao maior e ao menor cromossomo do cariótipo, respectivamente.

7.4.2 - Sítios de DNA repetitivo

Citogeneticamente, menos de 1,8% das espécies de aranhas foram analisadas (Araujo et al., 2020), desse total aproximadamente 10% foram avaliadas em relação à localização das RONS. O presente estudo incorpora mais cinco espécies a esses dados, todas elas com sítios de DNAr 18S localizados em cromossomos autossômicos, o que parece ser um padrão ancestral em Opisthothelae, uma simplesiomorfia de Mygalomorphae e Araneomorphae (Král et al., 2013); contudo diversas famílias basais em em Araneomorphae apresentam como sinapomorfia a presença de RONS em cromossomos sexuais, como observado em Filistatidae (Paula-Neto et al., 2017) em famílias do clado “Synspermiata” (Oliveira et al., 2007; Král et al., 2006), descrito por Wheeler et al (2016).

Outra característica que se mostrou bastante conservada em relação às RONS, foi sua localização na posição terminal dos cromossomos (Stávale et al., 2010,2011; Dolejš et al., 2011; Král et al., 2013, Forman et al., 2013; Araujo et al., 2014, Rincão et al., 2017; Paula-Neto et al., 2017, presente estudo, entre outros), com exceção de *Physocyclus globosus* (Taczanowski, 1874), Pholcidae, (Oliveira et al., 2007), *Hamatiliwa* sp., Oxyopidae (Stávale et al., 2011), e em *Isehonothele caudata* (Ausserer, 1875) e *Linothele megatheloides* Paz e Raven, 1990, Dipluridae (Král et al., 2013) que apresentaram RONS intersticiais, uma característica considerada derivada em aranhas (Král et al., 2013). Forman et al. (2013) sugerem ainda, que a posição terminal das RONS atuaria prevenindo eventos de dispersão por



transposição e translocação, o que explicaria o padrão conservado observado na maior parte das espécies analisadas, incluindo *Isoctenus*.

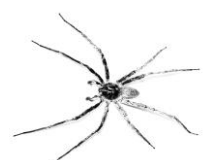
Segundo a filogenia mais recente do gênero, proposta por Polotow e Brescovit (2009), é possível perceber dois ramos bem evidentes dentro de *Isoctenus*, onde *I. ordinario* ocupa a posição basal no clado que abriga *I. janeirus*, *I. corymbus* e *I. coxalis*, e no outro ramo estão, juntamente com outras espécies, *I. herteli* e *I. strandi* (**Fig. 5**). Das cinco espécies onde foram detectados os sítios de DNAr 18S, *I. coxalis*, *I. hertili*, *I. janeirus* e *I. strandi* mostraram apenas um par autossômico marcado, e apenas *I. ordinario* apresentou dois pares portadores das sequências.

Assim embora a presença de RONS em dois pares autossômicos possa ser uma característica ancestral em Entelegynae, e Lycosoidea (Dolejš et al., 2011; Král et al., 2013), nossos dados sugerem que, é mais parcimonioso que o ancestral de *Isoctenus* possuisse apenas um par autossômico portador sítios de DNAr 18S, bem como apenas um par portador dos genes de histona H3, com *I. ordinário* apresentando um padrão derivado dentro do gênero, para esta característica. Durante a evolução do gênero eventos de dispersão dos sítios ribossomais podem ter influenciando na diferenciação do cariótipo de *I. ordinario* de forma independente ao das demais espécies (**Fig. 5**).

Entretanto, é preciso considerar que apenas seis das 16 espécies do gênero foram analisadas até o momento, e que muitas das ramificações da filogenia proposta por Polotow e Brescovit (2014) são embasadas em caracteres que não estão livres de homoplasias. Além disso, a descrição de novas espécies e a revisão de espécies mal posicionadas em outros gêneros, como foi o caso de *Isoctenus guadalupaei* (Mello-Leitão, 1941), transferida de *Ctenus* por Polotow e Brescovit (2019b), ainda podem alterar as relações entre as espécies do gênero e, portanto, influenciar na interpretação sobre a evolução dos cariótipos dentro do gênero.

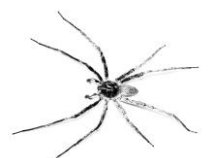
Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Ambiental do Paraná – IAP e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade pelo apoio nas Unidades de Conservação. Esta pesquisa também foi apoiada por uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código 001, e pelas Fundações Araucária e Grupo Boticário (001/2017) e pelo CNPq (303028/2014-9 – ADB).

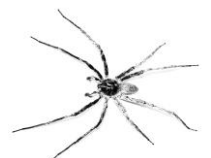


7.5 - Referências

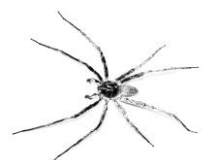
- Araujo D, Rheims CA, Brescovit AD, Cella DM (2008) Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(2), 89–95.
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM (2012) Sex Chromosomes and Meiosis in Spiders: A Review. In A. Swan (Ed.), *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*.
- 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(2), 83–88.
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM (2015) Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. *Journal of Arachnology*, 43(2), 174–181.
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM (2020) The spider cytogenetic database. Online at www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase. Accessed on 10/01/2020
- Bertkau P (1880) Verzeichnis der von Beneden in Brasilien gesammelten Arachniden. *Memoires Couronnes et Memoires Des Savants Etrangers (Bruxelles)*, 43, 1–120.
- Cabral-De-Mello DC, Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011a) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: Contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(1–2), 89–93.
- Cabral-De-Mello DC, Moura RC, Martins C (2011b) Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenetic and Genome Research*, 134(2), 127–135.
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho J P M (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research*, 17(3), 397–404.
- Dolejš P, Kořínková T, Musilová J, Opatová V, Kubcová L, Buchar J, Král J (2011) Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology*, 108(1), 1–16.
- Forman M, Nguyen P, Hula V, Král J (2013) Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 43–49.
- Hubbell R (1985) Silver Staining as an Indicator of Active Ribosomal Genes. *Stain Technology*, 60(5), 285–294.



- KRÁL, Jiří et al. (2006). Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). **Chromosome Research**, 14(8) p. 859-880.
- Král J, Kořínková T, Forman M, Krkavcová L (2011) Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(1), 43–66.
- Král J, Kořínková T, Krkavcová L, Musilová J, Forman M, Herrera IMÁ, Haddad CR, Vítková M, Henriques S, Vargas JGP, Hedin M (2013) Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2), 377–408.
- Kumar SA, Venu G, Jayaprakash G, Venkatachalaiah G (2016) Studies on chromosomal characteristics of *Ctenus indicus* (Gravely 1931) (Araneae: Ctenidae). *Nucleus (India)*, 60(1), 17–23.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201–220.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic and Histochemistry*, 87(7), 433–438.
- Miller DA, Dev VG (1976) Suppression of Human Nucleolus Organizer Activity in Mouse-Human Somatic Hybrid Cells. *Experimental Cell Research*, 101, 235–243.
- Oliveira RM, Jesus AC, Brescovit AD, Cella MD (2007) Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall, 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocylus globosus* (Taczanowski, 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). *Journal of Arachnology*, 35(2), 293–306.
- Paula-Neto E, Cella DM, Araujo D, Brescovit AD, Schneider MC (2017) Comparative cytogenetic analysis among filistatid spiders (Araneomorphae: Haplogynae). *Journal of Arachnology*, 45(1), 123–128.
- Polotow D, Brescovit AD (2009) Revision and cladistic analysis of *Isoctenus* and description of a new neotropical genus (Araneae, Ctenidae, Cteninae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155(3), 583–614.
- 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.
- Polotow D, Brescovit AD (2019a) Almost eight decades later: Description of the male of *Isoctenus guadaluppei* (Mello-Leitão, 1941) comb. nov. and redescription of the female. *Zootaxa*, 4683(2), 291–294.
- Polotow D, Brescovit AD (2019b) *Guasuctenus* gen. Nov., a new Neotropical spider genus of Ctenidae (Araneae). *Zootaxa*, 4624(4), 539–550.



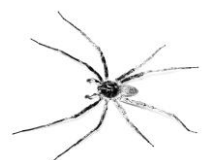
- Rincão MP, Chavari JL, Brescovit AD, Dias AL (2017) Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): Detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comparative Cytogenetics*, 11(4), 627–639.
- Rowell DM, Main BY (1992) Sex Ratio in the Social Spider *Diaea socialis* (Araneae: Thomisidae). *The Journal of Arachnology*, 20(3), 200–206.
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2000) *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Stávale LM, Schneider MC, Araujo D, Brescovit AD, Cella DM (2010) Chromosomes of Theridiidae spiders (Entelegynae): Interspecific karyotype diversity in *Argyrodes* and diploid number intraspecific variability in *Nesticodes rufipes*. *Genetics and Molecular Biology*, 33(4), 663–668.
- Stávale LM, Schneider MC, Brescovit AD, Cella DM (2011) Chromosomal characteristics and karyotype evolution of Oxyopidae spiders (araneae, entelegynae). *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 752–763.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304–306.
- Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA., Griswold CE et al. (2016) The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 33(6), 574–616.
- World Spider Catalog (2020) World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 10/01/2020.



8 - CAPÍTULO 3

**Primeira descrição citogenética para *Ancylometes* (Araneae, Ctenidae):
mapeamento da heterocromatina e DNA repetitivo em *Ancylometes
concolor* (Perty, 1833)**

Este artigo será submetido para publicação na Genetics and Molecular Biology.



Primeira descrição citogenética para *Ancylometes* (Araneae, Ctenidae): mapeamento da heterocromatina e DNA repetitivo em *Ancylometes concolor* (Perty, 1833)

Matheus P. Rincão¹, Antonio D. Brescovit², Ana L. Dias¹

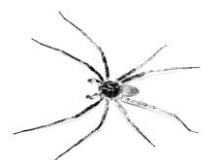
¹Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Londrina, Brasil. ²Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Matheus P. Rincão – Autor correspondente (rincaom@gmail.com)

Resumo:

Ctenidae está entre as mais abundantes famílias de aranhas encontradas nas florestas tropicais do planeta, contudo, muito pouco se conhece da citogenética da família pois, dos 48 gêneros, apenas 9 tiveram alguma espécie analisada. Nesse sentido, o presente estudo visa diminuir a lacuna de conhecimento existente dentro de Ctenidae, realizando a descrição citogenética de *Ancylometes concolor*, por meio de uma análise meiótica e mitótica, e de um mapeamento dos sítios de DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva. Foram analisados um total de 35 indivíduos, entre quatro locais de coleta diferentes, por meio de coloração convencional com Giemsa, bandeamento C, coloração com DAPI e CMA3, e FISH utilizando sondas de DNAr 18S e de histona H3. Foi evidenciado um cariótipo composto por 26 cromossomos com sistema cromossômico sexual do tipo X_1X_20 , sendo a primeira descrição deste número diploide para Ctenidae. O bandeamento C e a coloração com fluorocromos base-específicos mostraram blocos de heterocromatina GC ricos dispersos nas regiões centroméricas e intersticiais de todos os cromossomos, característica rara em aranhas. Também foi realizado um mapeamento da heterocromatina em paquítenos, evidenciando mais de 60 regiões intersticiais no cariótipo de *A. concolor*, ressaltando a importância da análise de fases meióticas no estudo citogenético de aranhas. A FISH evidenciou RONS simples, no par 6, além de dois bivalentes portadores dos sítios de histona H3. Assim, o presente trabalho contribuiu com a descrição citogenética de mais um gênero de Ctenidae, além de empregar diferentes marcadores cromossômicos combinados que ajudaram a criar um perfil cariotípico para *Ancylometes concolor*.

Palavras chave: Citogenética de aranhas, DNAr 18S, FISH, Histona H3.



8.1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de Araneomorphae, *Ancylometes* Bertkau 1880 e *Phoneutria* Perty 1833 estão entre as maiores aranhas neotropicais da infraordem, podendo atingir 20 cm de comprimento, ao considerar a extensão das pernas (Höfer e Brescovit 2000). As espécies do gênero *Ancylometes* apresentam hábitos noturnos, vivendo sobre o solo e se escondendo em abrigos naturais durante o dia, são comuns nas florestas neotropicais, principalmente associadas à vegetação ribeirinha (Höfer e Brescovit 2000). Atualmente, o gênero conta com 11 espécies descritas, 9 delas ocorrem no Brasil (World Spider Catalog 2019), sendo que no estado do Paraná há registro para pelo menos duas espécies, *A. rufus* (Walckenaer 1837) e *A. concolor* (Perty 1833) (Höfer e Brescovit 2000). Atualmente, o gênero pertence a Ctenidae, transferido de Pisauridae por Silva-Dávila (2003).

Até o momento, apenas 9 dos 48 gêneros de Ctenidae (World Spider Catalog 2019; Rincão et al. enviado para publicação) apresentam alguma descrição citogenética (**Tabela 1**), *Anahita* Karsch 1879, *Asthenoctenus* Simon 1897, *Ctenus* Walckenaer 1805, *Enoploctenus* Simon 1897, *Guasuctenus* Polotow e Brescovit 2019, *Parabatinga* Polotow e Brescovit 2009, *Phoneutria* e *Viracucha* Lehtinen 1953, de modo que *Ancylometes* ainda permanece desconhecido (Araujo et al. 2020). A família apresenta três números diploides diferentes, $2n\♂=22$ ($20+X_1X_20$) em *Asthenoctenus borellii* Simon 1897 (Araujo et al. 2014), $2n\♂=29$ ($26+X_1X_2X_30$) em *Anahita fauna* Karsch 1879 (Chen 1999) e *V. andicola* (Simon 1906) (Araujo et al. 2014) e $2n\♂=28$ ($26+X_1X_20$) nas demais espécies analisadas (Araujo et al. 2014; Kumar et al. 2016; Rincão et al. 2017; Rincão et al. enviado para publicação).

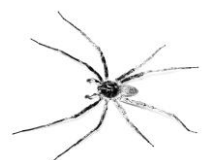
Dados citogenéticos como mapeamento da heterocromatina constitutiva (HC), ainda permanecem escassos em aranhas contudo, em Ctenidae, a HC foi mapeada em pelo menos sete espécies, sendo que em cinco delas se mostrou restrita às regiões pericentroméricas ou terminais do braço longo dos cromossomos, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling 1891), *Enoploctenus cyclothorax*, *Viracucha andicola* por Rincão et al. (2017), *Guasuctenus longipes* por Rincão et al. (enviado para publicação) e *Ctenus indicus* por Kumar et al. (2016); já em *C. medius* e *C. ornatus* (Rincão et al. 2017; Rincão et al. enviado para publicação) foram observados blocos de HC dispersos também na região intersticial dos cromossomos, sendo este último perfil considerado derivado dentro da família, de acordo com (Rincão et al. enviado para publicação).



Tabela 1: Espécies com dados citogenéticos em Ctenidae, atualizada a partir de Rincão et al. (2017). AgRON = Regiões Organizadoras de Nucléolo detectadas por impregnação com nitrato de prata. FISH = *Fluorescence in situ Hybridization*. T = Terminal. I = Intersticial

Espécie	Número Diploide (♂)	RONs (nº do par)		FISH (histona H3)	Referência
		AgRON	FISH (rDNA18S)		
<i>Ancylometes concolor</i> (Perty, 1833)	2n=26 (24+X ₁ X ₂ 0)		6T	Múltiplas-T	Presente estudo
Acantheinae					
<i>Enoploctenus cyclothorax</i> (Bertkau, 1880)	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)		6T	Simples-T	Rincão et al., 2017
Acanthoeteninae					
<i>Nothroctenus</i> sp.	2n=29 (26+X ₁ X ₂ X ₃ 0)		6T		Araujo et al., 2014
<i>Viracucha andicola</i> (Simon, 1906)	2n=29 (26+X ₁ X ₂ X ₃ 0)	6T, 10T	Simples-T		Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017
Cteninae					
<i>Anahita fauna</i> Karsch, 1879	2n=29 (26+X ₁ X ₂ X ₃ 0)				Chen, 1999
<i>Ctenus indicus</i> (Gravely, 1931)	2n=28 (26+X ₁ X ₂ X ₃ 0)	8T, 10T			Kumar et al., 2016
<i>Ctenus medius</i> Keyserling, 1891	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)		Simples-T 13T	5T, 7T, 9T	Rincão et al., 2017; Rincão et al.*
<i>Ctenus ornatus</i> (Keyserling, 1877)	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)		10T Simples-T 12T	2T, 8T, 11I, 13I	Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017; Rincão et al.*
<i>Ctenus</i> sp.	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)				Araujo et al., 2014
<i>Guasuctenus longipes</i> Polotow e Brescovit, 2019s	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)		9T, 11T	4T	Rincão et al.*
<i>Parabatinga brevipes</i> (Keyserling, 1891)	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)				Araujo et al., 2014
<i>Phoneutria nigriventer</i> (Keyserling, 1891)	2n=28 (26+X ₁ X ₂ 0)		10T Múltiplas-T		Araujo et al., 2014; Rincão et al., 2017
Viridasiinae					
<i>Asthenoctenus borelii</i> Simon, 1897	2n=22 (20+X ₁ X ₂ 0)				Araujo et al., 2014

* Artigo enviando para publicação



O uso de marcadores cromossômicos, por meio da citogenética molecular, embora tenham ganhado importância nas análises cariotípicas em diversos grupos de animais (Cabral-de-Mello et al. 2011; Pine et al. 2017; Usso et al. 2019), ainda são pouco empregados em aranhas. Em Lycosoidea há apenas quatro registros do emprego da FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) na análise das espécies do grupo: Suzuki e Kubota (2011), que também mapearam genes associados à produção de seda em aranhas e de DNAr 5S, em *O. sertatus* L. Koch 1878; Forman et al. (2013) hibridizaram sondas de DNAr 18S em *Wadicosa fidelis* (O.Pickard-Cambridge 1872); Rincão et al. (2017), que utilizaram sondas de DNAr 18S em cinco espécies de Ctenidae; e Rincão et al. (enviado para publicação), que mapearam a distribuição de sequências de DNAr 18S e genes de histona H3 em *C. medius*, *C. ornatus* e *Guasuctenus longipes*.

Assim, frente a necessidade de se ampliar o número de espécies e gêneros de Ctenidae com análises citogenéticas, e a importância dos bandeamentos cromossômicos no entendimento das relações evolutivas entre os cariótipos e na citotaxonomia do grupo, o presente estudo teve por objetivo descrever citogeneticamente *Ancylometes concolor*. Além de realizar um mapeamento dos blocos de heterocromatina em células de paquítenos, evidenciando a importância dessa fase como modelo de estudo em Ctenidae.

8.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados ao todo 35 indivíduos de *Ancylometes concolor*, entre juvenis e adultos, distribuídos entre quatro localidades, na Base de Estudo do Pantanal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, e em três Unidades de Conservação localizadas no estado do Paraná, Brasil, como mostrado na **Tabela 2**. Os espécimes foram depositados na coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSP, Curador: AD Brescovit), São Paulo/SP, Brasil.

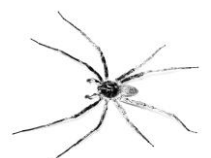


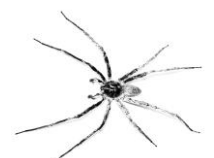
Tabela 2: Relação de indivíduos de *Ancylometes concolor* analisados, distribuídos por sexo e locais de coleta. PARNA = Parque Nacional. UFMS = Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Espécie	Amostra		Local de Coleta
	♂	♀	
<i>A. concolor</i> (Perty, 1833)	13	6	Base de Estudos do Pantanal – UFMS – Corumbá – MS W 57° 01' 08,70", S 19° 34' 36,90"
	8		PARNA de Superagui – Guaraqueçaba - PR W 48° 13' 51,9", S 25° 27' 14,40"
	2		PARNA de Foz do Iguaçu – Foz do Iguaçu - PR W 54° 28' 35,40", S 25° 37' 34,00"
	4	2	PARNA de Ilha Grande – Icaraíma - PR W 53° 44' 38,80", S 23° 21' 12,50"

As preparações cromossômicas seguiram o descrito por Araujo et al. (2008), com as modificações realizadas por Rincão et al. (2017). Os cromossomos foram classificados seguindo a classificação proposta por Levan et al. (1964). O bandeamento C seguiu o descrito por Sumner (1972), e as lâminas foram coradas com iodeto de propídio (Lui et al., 2012).

A FISH seguiu o proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). As sondas de DNAr 18S utilizadas foram obtidas por Rincão et al. (2017) marcadas com o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) e detectada com Avidin-FITC (Invitrogen). As sondas de Histona H3 utilizadas foram obtidas por Rincão et al. (enviado para publicação) e marcadas com Cy3 dUTP (GE Healthcare) por PCR, utilizando o par de primers M13.

As lâminas foram observadas no microscópio de epifluorescência Leica DM 2000, equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens foram capturadas com auxílio do programa Motic Images Advanced, versão 3.2. Foram observadas 30 células, incluindo mitose e meiose, para se determinar o número diploide das espécies e morfologia cromossômica. Para montagem dos cariótipos foram analisadas 10 metáfases mitóticas.



8.3 - RESULTADOS

8.3.1 - Caracterização citogenética de *Ancylometes concolor*

A análise das células meióticas revelou cromossomos isopicnóticos em paquítenos de fêmeas (**Fig. 1a**), diferente dos paquítenos de machos, onde foram observados dois cromossomos heteropicnóticos positivos, correspondentes aos cromossomos sexuais (**Fig. 1b**). Esse comportamento de coloração diferenciada se manteve até a fase de diplóteno (**Fig. 1c, d**). Os cromossomos sexuais mostraram associação em paralelo até o final da primeira divisão meiótica, como possível observar em diacinese e metáfase I (**Fig. e, f**, respectivamente), e segregaram juntos para o mesmo polo durante a primeira divisão meiótica, evidenciado pela ocorrência de células em metáfase II com 12 ou 14 cromossomos (**Fig. g, h**, respectivamente).

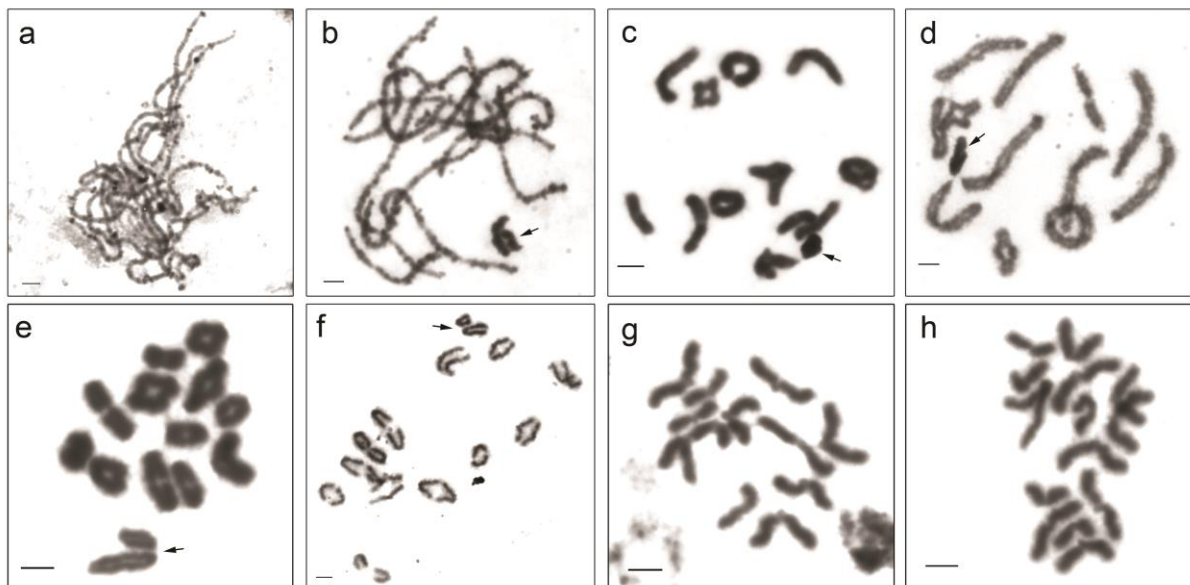
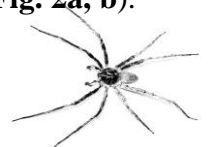


Figura 1: Células meióticas de *Ancylometes concolor*. **a, b** paquítenos de fêmea e macho, respectivamente, evidenciando comportamento de heteropicnose positiva dos sexuais em machos (seta). **c – h** células de macho. **c, e d** diplótenos, **e** diacinese, **f** metáfase I, mostrando comportamento de associação em paralelo dos cromossomos sexuais (setas). **g – h** metáfases II, mostrando células com 12 e 14 cromossomos respectivamente. Barra de escala = 10 μ m.

Os cariótipos de metáfases mitóticas permitiram confirmar o número diploide de $2n=26$ em machos e $2n=28$ em fêmeas, e os cromossomos sexuais X_1 e X_2 ($2n=24 + X_1X_20$) foram identificados como sendo um cromossomo de tamanho grande, similar ao par 3, e um cromossomo de tamanho pequeno, similar em tamanho ao par 8, respectivamente (**Fig. 2a, b**).



Todos os cromossomos apresentaram morfologia exclusivamente acrocêntrica. Além disso foi possível observar uma constrição secundária terminal no par 6 (**Fig 2b**).

O bandeamento C, realizado em metáfases mitóticas, revelou uma grande quantidade de heterocromatina, com blocos dispersos tanto nas regiões centroméricas e terminais, quanto nas regiões intersticiais de todos os cromossomos, incluindo os dois sexuais (**Fig. 2c**), identificadas, em sua maioria, como sendo blocos ricos em GC, como evidenciado pela coloração com CMA₃ (**Fig. 2d**).

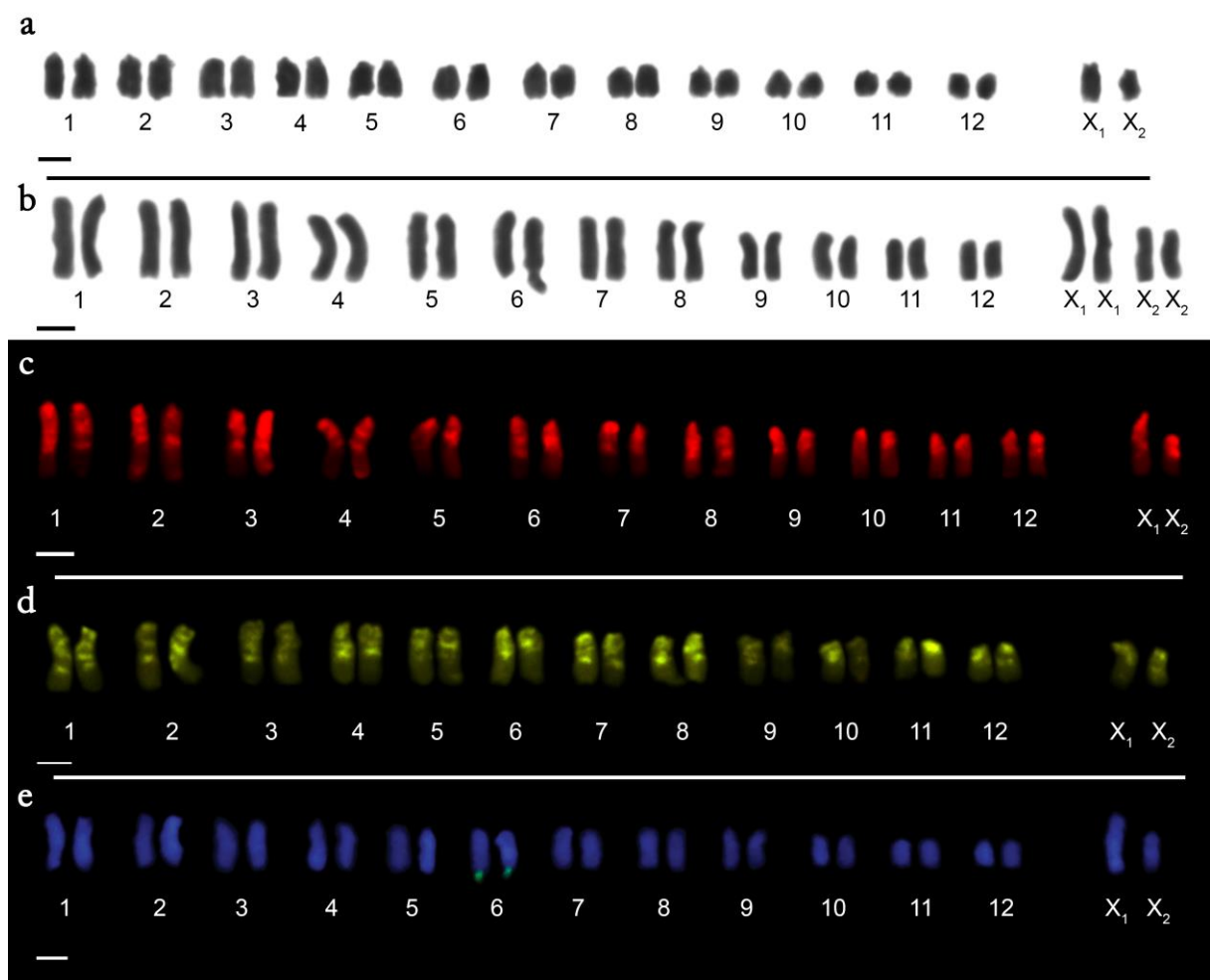


Figura 2: Cariótipos de metáfases mitóticas de *Ancylozetes concolor*. **a** macho. **b** fêmea. **c** banda C corado com iodeto de propídeo. **d** fluorocromo CMA₃. **e** FISH com sonda de DNAr 18S, evidenciando o par 6 como portador dos sítios ribossomais. Barra de escala = 10 μ m.

A FISH com sonda de DNAr 18S mostrou marcações em apenas um par autossômico, o par 6 (**Fig. 2e**), confirmado também pela hibridização em fases de meiose, como pode ser



observado em diacinese na **Fig. 3a**. A hibridização com sonda de histona H3, permitiu evidenciar em células de diacinese dois bivalentes autossômicos portadores dos sítios, como mostrado na **Fig. 3b**.

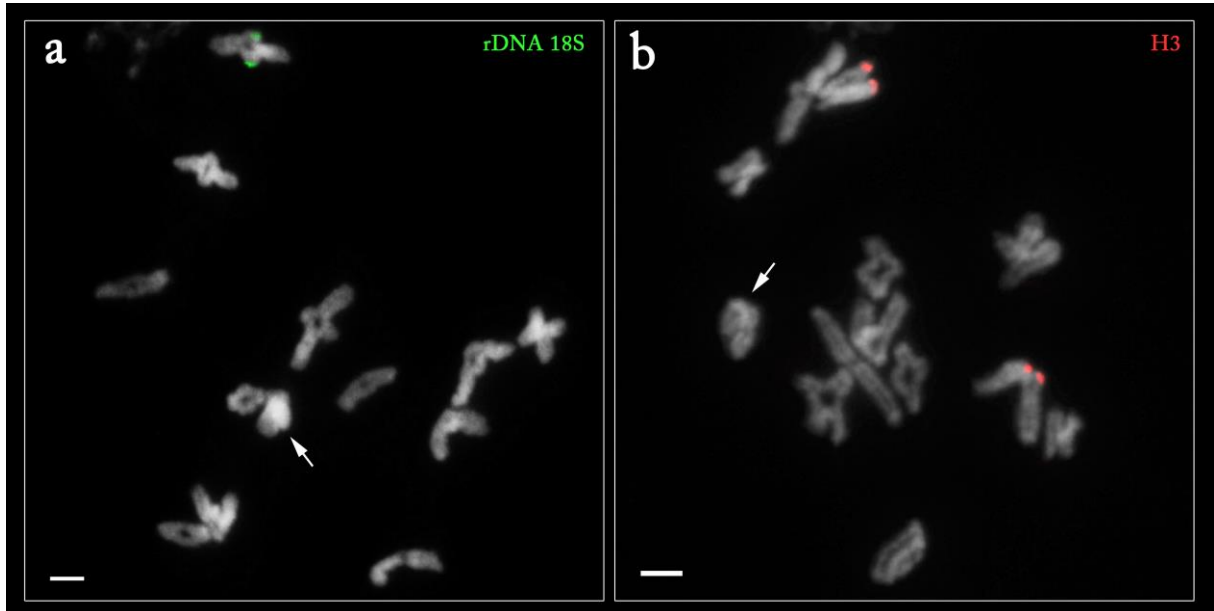
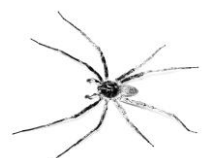


Figura 3: Células meióticas de machos de *Ancylozetes concolor* submetidas à FISH. As setas indicam os cromossomos sexuais. **a** diplóteno, evidenciando um bivalente marcado com sonda de DNAr 18S, em verde. **b** diplóteno, evidenciando dois bivalentes marcados com sonda de histona H3. Barra de escala = 10 μ m.

8.3.2 - Mapeamento dos blocos de heterocromatina constitutiva

O bandeamento C realizado em células de paquíteno de machos, permitiu a montagem de um cariótipo, e por sua vez a construção de um ideograma representando um mapeamento da localização e quantidade de blocos de heterocromatina constitutiva em espécimes de *Ancylozetes concolor*, da população do Pantanal. Foi observado um total de 60 regiões intersticiais mapeadas, como mostra a **Figura 4**. Para a construção do ideograma foram analisados 10 paquítenos, contudo, devido à alta condensação dos cromossomos sexuais durante esta fase, não foi possível mapear os blocos heterocromáticos em ambos, X₁ e X₂.



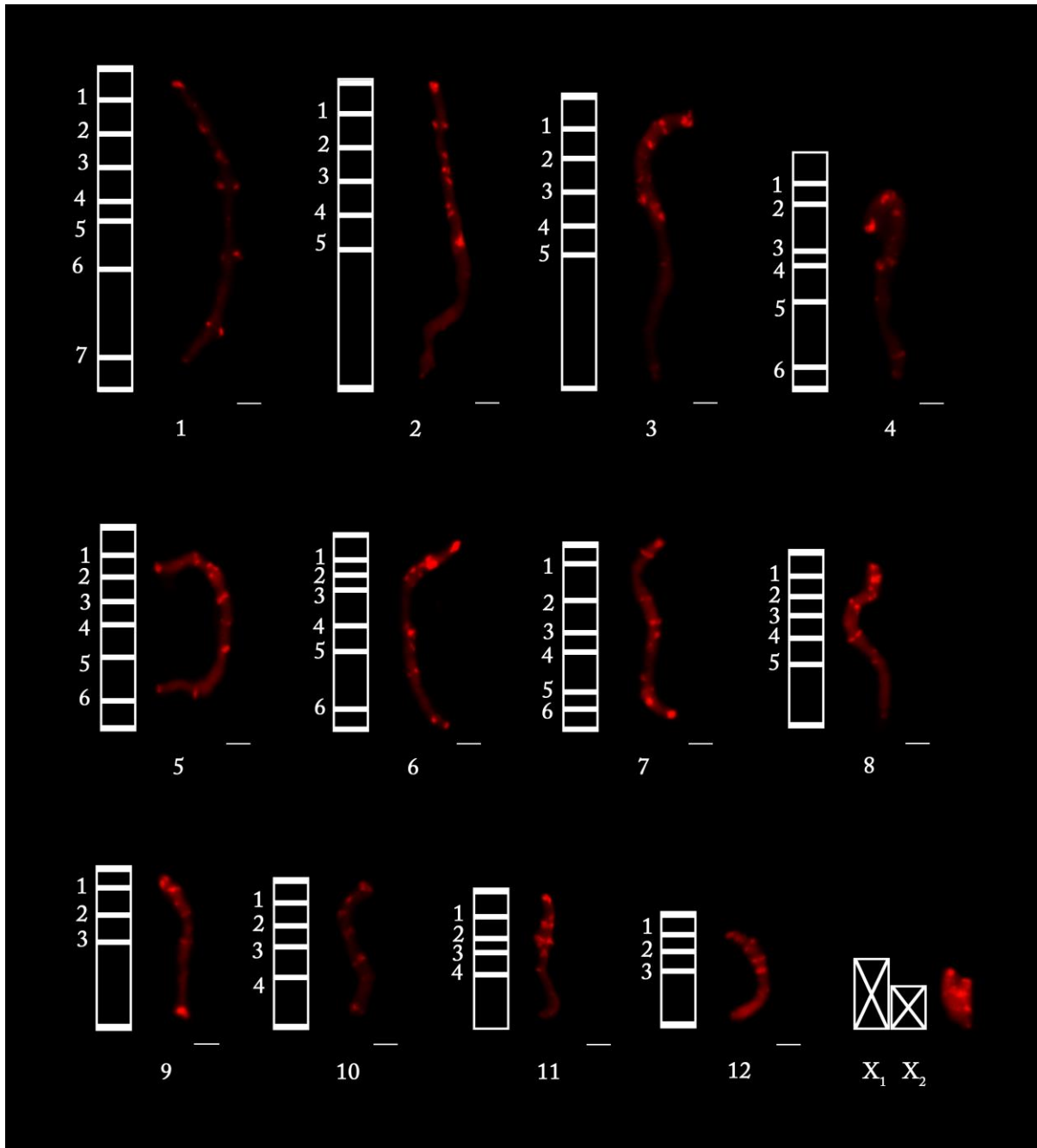


Figura 4: Cariótipo de *Ancylozetes concolor* obtido de células em paquíteno de macho submetido ao bandeamento C e ideograma representando os blocos heterocromáticos em cada bivalente.

8.4 - DISCUSSÃO

8.4.1 - Número diploide e citotaxonomia

A ordem das aranhas, atualmente representada por mais de 48 mil espécies, é amplamente diversa em aspectos morfológicos e citogenéticos, com um número diploide que



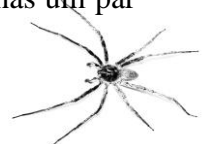
varia de $2n_{\sigma}=5$ em *Afrilobus* sp. até $2n_{\sigma}=152$ em *Caponia natalenses* (O. Pickard Cambridge 1874) (Král et al. 2019), Orsolobidae e Caponiidae, respectivamente. Contudo, ao considerarmos Lycosoidea, superfamília que abriga, além de Ctenidae, Lycosidae, Trechaleidae, Pisauridae, Thomisidae, Psecridae e Oxyopidae (Wheeler et al. 2016), observa-se uma menor variação, de $2n_{\sigma}=11$ em *Oxyopes salticus* Hentz, 1845 (Stávale et al. 2011) até $2n_{\sigma}=29$ encontrado em duas espécies de Ctenidae, *Viracucha andicola* (Simon 1906) (Araujo et al. 2014) e *Anahita fauna* Karsch 1879 (Chen 1999) e em uma espécie de Pisauridae, *Pisaura* sp. (Srivastava e Shukla 1986).

O cariótipo apresentado por *Ancylometes concolor* representa a primeira ocorrência de $2n_{\sigma}=26$ ($24+X_1X_20$) em Ctenidae, sendo que na família há três números diploides diferentes, $2n_{\sigma}=22$ ($20+X_1X_20$) em *Nothroctenus* sp. (Araujo et al. 2014), $2n_{\sigma}=29$ ($26+X_1X_2X_30$), nas espécies mencionadas anteriormente, e $2n_{\sigma}=28$ ($26+X_1X_20$) nas demais espécies da família (Tabela 1). Dentro de Lycosoidea, $2n_{\sigma}=26$ também não é um cariótipo muito frequente, ocorre apenas em duas espécies de Pisauridae, *Dolomedes fimbriatus* (Clerck 1757) (Painter 1914) e *D. scriptus* Hentz, 1845 (Sokolov 1960), e em 20 das 120 espécies cariotipadas de Lycosidae (Araujo et al., 2020), como em algumas espécies do gênero *Arctosa* C. L. Koch, 1847 (Hackman 1948; Dolejš et al. 2011). E, embora até o momento não haja registro desse número diploide nas outras quatro famílias do clado, isso pode ser apenas uma reflexo do baixo número de espécies analisadas nessas famílias (Araujo et al. 2020).

Wheeler et al. (2016) declararam *Ancylometes* um gênero de posição ainda incerta, como grupo irmão de Lycosoidea, fora de Ctenidae. Originalmente, *Ancylometes* era atribuído à Pisauridae, sendo transferido para Ctenidae pela primeira vez por Lehtinen (1967), e mais recentemente por Silva-Dávila (2003), o que foi confirmado por Polotow e Brescovit (2015). Contudo, nas análises de Silva-Dávila (2003), *Ancylometes* aparece como grupo irmão de *Cupiennius* Simon, 1891, gênero que foi recentemente transferido para Trechaleidae por Piacentini e Ramírez (2019). Assim, apesar da posição do gênero ainda permanecer mal resolvida em Lycosoidea, o perfil cariotípico observado nessa espécie, principalmente o $2n=26$, aponta uma diferença marcante com os demais cariótipos descritos em Ctenidae, o que pode corroborar os dados filogenéticos de Wheeler et al., (2016).

8.4.2 – Mapeamento de DNA repetitivo e heterocromatina

As RONS simples evidenciadas pelas FISH em *A. concolor*, no presente estudo, mantém Ctenidae como a única família em Lycosoidea a apresentar RONS em apenas um par

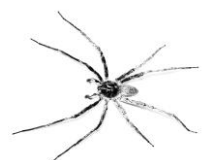


cromossômico (Stávale et al. 2011; Dolejš et al. 2011; Araujo et al. 2014; Kumar et al. 2016; Rincão et al. 2017; Rincão et al. enviado para publicação). Dados sobre a localização das RONS nessa superfamília estão disponíveis apenas para três das sete famílias, Lycosidae, Ctenidae e Oxyopidae. Nesta última, as duas únicas espécies analisadas, *Oxyopes salticus* Hentz, 1845 e *Hamataliwa* sp. apresentam RONS múltiplas em 3 e em 2 pares autossômicos, respectivamente (Stávale et al. 2011); dados similares são observados em Lycosidae, onde todas as espécies analisadas apresentaram dois autossômicos marcados (Dolejš et al. 2011).

A presença de RONS simples, evidenciadas por FISH, nas duas subfamílias basais de Ctenidae (Polotow e Brescovit 2014), Acantheinae, em *E. cyclothorax*, e Acanthocteninae, em *V. andicola* (Rincão et al. 2017) sugere que este possa ser um possível perfil ancestral para este marcador nessa família de aranhas. Contudo, o baixo número de espécies analisadas tanto na superfamília, quanto em Ctenidae, juntamente com a filogenia mal resolvida de *Ancylometes*, e dificulta determinar se houve uma redução no número de RONS a partir do ancestral dos ctenídeos,

O emprego de novos marcadores cromossômicos pode ser útil na tentativa de resolver as relações entre os cariótipos de Ctenidae, na medida em que padrões mais complexos vão sendo formados. Nesse sentido, o emprego das sondas de histona H3 em conjunto com o DNAr 18S tem criado perfis bastante característicos nas espécies analisadas, como observado por Rincão et al. (enviado para publicação), que mapearam a distribuição de histona H3 em *C. medius*, *C. ornatus* e em *Guasuctenus longipes*, todas em posição terminal, exceto pelos pares 11 e 13 em *C. ornatus*, que apresentaram marcações intersticiais. No presente estudo, nós observamos dois pares portadores dos genes de histona H3 em *A. concolor*, mostrando um perfil bastante similar ao observado nas duas espécies de *Ctenus* mencionadas, sugerindo que uma posição terminal dos sítios de H3 também correspondam a uma condição ancestral desses sítios, similar ao que é proposto para o DNAr 18S por Dolejš et al. (2011).

Além disso, também é provável que sítios múltiplos de histona H3 sejam uma característica derivada nas espécies, influenciada pela movimentação da heterocromatina dentro dos cariótipos, como propôs Rincão et al. (enviado para publicação). Os autores observaram que as espécies que apresentaram maior quantidade de heterocromatina, com blocos mais dispersos, também apresentaram uma maior quantidade de sítios de histona H3, incluindo marcações intersticiais, como nos pares 11 e 13 de *C. ornatus*, o que, até o momento, parece ser uma autapomorfia do cariótipo dessa espécie (Rincão et al. enviado para

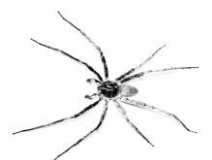


publicação). Entretanto, *A. concolor* apresentou uma grande quantidade de blocos heterocromáticos dispersos por todo o cariótipo, e, entretanto, os sítios de histona H3 foram localizados em apenas dois pares cromossômicos, em posição terminal, o que sugere que os mecanismos de dispersão da heterocromatina e dos sítios de DNA repetitivo possam ser diferentes nas duas espécies, *C. ornatus* e *A. concolor*.

Uma das hipóteses que poderia explicar essa relação diferenciada entre heterocromatina e histona H3 observada em *C. ornatus* e *A. concolor*, requer análises futuras, seria o envolvimento de diferentes classes de elementos transponíveis, os quais já foram evidenciados em associação com genes de histona H3 em peixes. Pucci et al. (2018) observaram um retrotransposon LTR da família *Gypsy* associado aos genes de histona H3 em espécies de *Characidium*. Estes mesmos autores sugerem que elementos de transposição podem ter atuado no processo de dispersão de outras histonas, H1 e H4, nas espécies analisadas. A própria distribuição da heterocromatina, em blocos intersticiais, parece ter surgido de forma independente nas duas espécies de aranhas, uma vez que *Ctenus ornatus* pertence à Cteninae, uma das subfamílias derivadas dentro de Ctenidae (Polotow e Brescovit 2014), enquanto *A. concolor* se mostrou basal dentro do grupo (Wheeler et al. 2016).

O mapeamento obtido pela análise dos paquítenos em *A. concolor*, permitiu a observação de mais de 60 blocos heterocromáticos intersticiais, com muitos blocos distribuídos de forma equidistante ao longo do cariótipo, o que sugere que a recombinação ectópica tenha sido uma dos principais mecanismos de dispersão da heterocromatina nessa espécie (Schweizer e Loidl 1987). Entretanto, não se descarta a influência de rearranjos cromossômicos como inversões e translocações, e atividade de elementos de transposição.

O bandeamento C em paquítenos se mostrou muito eficaz no mapeamento dos blocos heterocromáticos intersticiais, pois a alta condensação dos cromossomos mitóticos pode agrupar as várias regiões heterocromáticas, e mascarar as várias marcações intersticiais, fazendo corresponder a uma menor quantidade de blocos heterocromáticos. Por isso, é provável que o número de marcações intersticiais apresentados por Rincão et al. (enviado para publicação), para *C. ornatus*, esteja subestimado, uma vez que nesta espécie, a análise de metáfases mitóticas revelou a localização de apenas 18 regiões sítios intersticiais de heterocromatina. Vale ressaltar, que esses dados evidenciam tanto *C. ornatus* quanto *A. concolor* como potenciais modelos de estudo, para a investigação de rearranjos



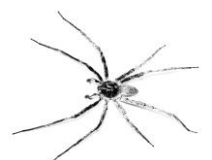
cromossômicos em aranhas, tal como inversões paracêntricas e deleções, que não alterem a morfologia cromossômica.

8.5 - CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente estudo sugerem que a diversidade cariotípica existente em Ctenidae esteja subestimada, levando em consideração que já foram descritos dois SCS e quatro diferentes números diploides, sendo que apenas 13 espécies, distribuídas entre 10 gêneros, tiveram informações citogenéticas descritas, aproximadamente 2,5% das espécies da família. Além disso, esse estudo também contribui aumentando o número de gênero com descrições citogenéticas em Ctenidae, mostrando a importância do uso combinado de marcadores cromossômicos no estudo desses animais.

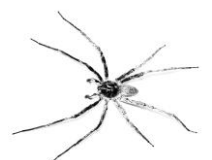
AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Ambiental do Paraná – IAP e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade pelo apoio nas Unidades de Conservação. Esta pesquisa também foi apoiada por uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código 001, e pelas Fundações Araucária e Grupo Boticário (001/2017) e pelo CNPq (303028/2014-9 – ADB).

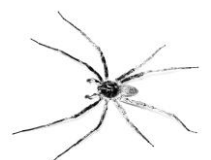


8.6 - REFERÊNCIAS

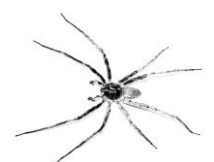
- Araujo, D., Rheims, C. A., Brescovit, A. D., Cella, D. M. (2008). Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(2), 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00457.x>
- Araujo, D., Oliveira, E. G. Giroti, A. M., Mattos, V. F., Paula-Neto, E., Brescovit, A. D., Schneider, M. C., Cella, D. M. (2014). Comparative Cytogenetics of Seven Ctenidae Species (Araneae). *Zoological Science*, 31(2), 83–88. <https://doi.org/10.2108/zsj.31.83>
- Araujo, D.; Schneider, M.C.; Paula-Neto, E.; Cella, D.M. (2020). The spider cytogenetic database. Online at www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase. Accessed on 10/01/2020
- Cabral-De-Mello, D. C., Martins, C., Souza, M. J., Moura, R. C. (2011). Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient proscopiidae grasshopper species: Contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(1–2), 89–93. <https://doi.org/10.1159/000317476>
- Chen, S. H. (1999). Cytological Studies on Six Species of Spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, and Ctenidae). *Zoological Studies*, 38(4), 423–434.
- Dolejš, P., Kořínková, T., Musilová, J., Opatová, V., Kubcová, L., Buchar, J., & Král, J. (2011). Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology*, 108(1), 1–16. <https://doi.org/10.14411/eje.2011.001>
- Forman, M., Nguyen, P., Hula, V., Král, J. (2013). Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 43–49. <https://doi.org/10.1159/000351041>
- Hackman, W. (1948). Chromosomentudien an Araneen mit besonderer berücksichtigung der geschlechtschromosomen. *Acta Zoologica Fennica*, 1–101.
- Höfer, H., & Brescovit, A. D. (2000). A revision of the Neotropical spider genus *Ancylometes* Bertkau (Araneae: Pisauridae). *Insect Systematics & Evolution*, 31(3), 323–360. <https://doi.org/10.1163/187631200X00075>
- Král, J., Forman, M., Kořínková, T., Lerma, A. C. R., Haddad, C. R., Musilová, J., et al. (2019). Insights into the karyotype and genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39034-3>
- Kumar, S. A., Venu, G., Jayaprakash, G., Venkatachalaiah, G. (2016). Studies on chromosomal characteristics of *Ctenus indicus* (Gravely 1931) (Araneae: Ctenidae). *Nucleus (India)*, 60(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0191-2>



- Lehtinen, P. T. (1967). Classification of the Cribellate spider and some allied families, with notes on the evolution of suborder Araneomorpha. *Annales Zoologici Fennici*, 4, 199–468.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Lui, R. L., Blanco, D. R., Moreira-Filho, O., & Margarido, V. P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic and Histochemistry*, 87(7), 433–438. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.696700>
- Painter, T. S. (1914). Spermatogenesis in spiders. *Zoologisch Jahrbuecher Abteilung Fuer Anatomie Und Ontogenie Der Tiere*, 38, 509–576.
- Piacentini, L. N., Ramírez, M. J. (2019). Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.004>
- Pine, M. B., Gallo, R. B., da Silva, C. R. M., Pezenti, L. F., de Domenico, F. C., Loreto, V., & da Rosa, R. (2017). Chromosome mapping in *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) (orthoptera) from the iguaçu national park - foz do iguaçu, Paraná, Brazil. *Comparative Cytogenetics*, 11(2), 203–212. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i2.10282>
- Polotow, D., Brescovit, A. D. (2014). Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170, 333–361. <https://doi.org/10.1111/zoj.12101>
- Polotow, D., Carmichael, A., & Griswold, C. E. (2015). Total evidence analysis of the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae). *Invertebrate Systematics*, 29(2), 124–163. <https://doi.org/10.1071/IS14041>
- Pucci, M. B., Nogaroto, V., Moreira-Filho, O., & Vicari, M. R. (2018). Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 585–592. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0121>
- 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. *Comparative Cytogenetics*, 11(4), 627–639. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.10620>
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2000). *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers, Oxford. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1169>
- Schweizer, D., Loidl, J. (1987). A model for heterochromatin dispersion and evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today*, 9, 61–74. https://doi.org/10.1007/978-94-010-9166-4_7



- Silva Davila, D. (2003). Higher-Level Relationships of the Spider Family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 274, 1–86. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2003\)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2003)274<0001:HLROTS>2.0.CO;2)
- Sokolov, I. I. (1960). Studies on nuclear structures in spiders (Araneina). I. Karyological peculiarities in spermatogenesis. *Voprosy Cytologii i Protistologii*, 160–186.
- Srivastava, M. D. L., & Shukla, S. (1986). Chromosome number and sex-determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. *Chromosome Information Service*, 41, 23–26.
- Stávale, L. M., Schneider, M. C., Brescovit, A. D., & Cella, D. M. (2011). Chromosomal characteristics and karyotype evolution of Oxyopidae spiders (araneae, entelegynae). *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 752–763. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1084>
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Suzuki, G., Kubota, S. (2011). 5S ribosomal DNA cluster of a lynx spider *Oxyopes sertatus* includes a histone H2B-like gene in the spacer region (NTS). *Chromosome Science*, 14(1+2), 3–8. <https://doi.org/10.11352/scr.14.3>
- Uso, M. C., Santos, A. R. Dos, Gouveia, J. G., Frantine-Silva, W., Araya-Jaime, C., Oliveira, M. L. M., Foresti, F., Giuliano-Caetano, L., Dias, A. L. (2019). Genetic and chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and DNA barcoding. *Zebrafish*, 16(1), 87–97. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1576>
- Wheeler, W. C., Coddington, J. A., Crowley, L. M., Dimitrov, D., Goloboff, P. A., Griswold, C. E., et al. (2017). The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 33(6), 574–616. <https://doi.org/10.1111/cla.12182>
- Wise, D. (1983). An electron microscope study of the karyotypes of two wolf spiders. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(2), 161–168. <https://doi.org/10.1139/g83-028>
- World Spider Catalog (2020). World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on 10/01/2020. doi: 10.24436/2



9 - Considerações Finais

1. Todas as espécies apresentaram $2n_{\text{♂}}=28$ (X_1X_20), com exceção de *Ancylometes concolor*, que mostrou $2n_{\text{♂}}=26$ (X_1X_20), sendo esta a primeira descrição desse número diploide para Ctenidae.
2. Embora os cariótipos tenham se apresentado bastante conservados nas espécies analisadas, a presença de cromossomos subtelocêntricos em *Isoctenus janeirus*, *I. ordinario* e *I. strandi*, sugerem que rearranjos cromossômicos, do tipo inversões e translocações, podem ter atuado na diversificação dentro do gênero.
3. Foram obtidos dados de FISH em nove das 10 espécies analisadas, com marcações simples de DNAr 18S em todas as espécies, exceto em *Guasuctenus longipes* e *I. ordinário*, que apresentaram dois pares cromossômicos portadores dos sítios ribossomais, sendo que este último padrão parece corresponder ao perfil ancestral de *Isoctenus*.
4. Nosso estudo trouxe os primeiros dados de localização de genes histona de H3 em aranhas, que se mostraram eficazes como marcadores cromossômicos, se agrupando em apenas um par cromossômico na maioria das espécies. Um dos fatores que mais dificulta estabelecer relações evolutivas entre os cariótipos das espécies é o baixo número de espécies estudadas, de modo que muitas das espécies analisadas frequentemente se encontram distantes filogeneticamente umas das outras. Nesse sentido, o presente estudo contribui, significativamente, para o aumento no número de espécies analisadas citogeneticamente em Ctenidae, com 8 novas descrições. Além de fornecer uma análise mais consistente do clado onde estão inseridos *Guasuctenus* e *Isoctenus*.

