



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DE ARANHAS  
PERTENCENTES À FAMÍLIA LYCOSIDAE (ARACHNIDA,  
ARANEAE)**

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DE ARANHAS  
PERTENCENTES À FAMÍLIA LYCOSIDAE (ARACHNIDA,  
ARANEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. 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

C379e Cavenagh, Analiza Fernanda.  
Estudo citogenético em espécies de aranhas pertencentes a família Lycosidae (Arachnida, Araneae) / Analiza Fernanda Cavenagh. - Londrina, 2020.  
97 f.: il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.  
Dissertação (Mestrado 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. Cariótipo - Tese. 2. FISH - Tese. 3. Heterocromatina - Tese. 4. Rearranjos Cromossômicos - 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

ANALIZA FERNANDA CAVENAGH

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DE ARANHAS  
PERTENCENTES À FAMÍLIA LYCOSIDAE (ARACHNIDA, ARANEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marielle Cristina Schneider  
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais.  
Minha base em todos os sentidos da vida.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, sempre me dando força para estar firme diante dos obstáculos e usá-los da melhor maneira para meu crescimento como ser humano.

Agradeço a toda minha família, pelo apoio em cada obstáculo nos anos de mestrado, cada um com sua peculiaridade, se fez presente mesmo quando eu não estava presente, me deram força, amor e tiveram fé que meus passos estavam firmes e no caminho certo.

Um grande agradecimento ao Laboratório de Citogenética Animal (LACA), que me recebeu com todo carinho, me auxiliando e ensinando tudo que a citogenética podia me mostrar. Em especial aos companheiros diários de trabalho: Ana Beatriz, Felipe, Jaque, Mari, Matheus e Luis, que sempre estavam dispostos a me ajudar, muitas vezes ocupados com todos os trabalhos disponibilizavam um tempo para estar ao meu lado me ensinando. Vocês me receberam de braços abertos e podem ter certeza de que estarão comigo para sempre no meu coração, nenhum dia será igual sem cada um de vocês no dia a dia, em novos laboratórios e na vida.

Aquele agradecimento especial a minha orientadora Dra Ana Lúcia Dias, que não me conhecia e mesmo assim me acolheu em sua pesquisa, me ensinando além de uma nova área na genética, ao qual eu não tinha nenhuma base, e me trouxe para o mundo das aranhas juntamente com o Matheus Rincão, onde juntos me mostraram um trabalho em equipe admirável, cobranças sim, mas com objetividade. Obrigada pelo carinho, por todas as correções, dicas e empurrões. Acreditaram em mim quando eu não achei que seria capaz de receber tantas informações e poder trazer os belos frutos que vocês mereciam, espero ter conseguido.

Durante todo o projeto tive muito apoio do grupo ao qual conheci, que foi a turma de Mestrado que passou na seleção comigo, descobri pessoas incríveis que vou levar para toda vida. Agradeço especialmente ao Felipe que muitas vezes me deu aquele empurrão que faltava, sempre disposto a me ensinar, fosse pessoalmente ou por incessantes mensagens via WhatsApp. Não esquece de mim na França! Vou estar sempre torcendo por você. E ao Nicollas que é o chaveirinho que trouxe da UENP, seguimos juntos pelo caminho que escolhemos e estivemos sempre de apoio um do outro para que trilhar esses degraus fossem os mais leves possíveis.

Aos membros das bancas, que com suas considerações engrandeceram o desenvolvimento deste projeto, mostrando novos caminhos a serem trilhados, e possibilidades de pesquisa que fizeram toda a diferença. Muito Obrigada: Dra Ana Cláudia Swarça, Dra Marielle Cristina Schneider e Dra Renata da Rosa.

A minha amiga-irmã-cérebro, Michele Carina, que sempre me deu força em cada nova etapa, foi e sempre será aquela voz que te anima em momentos de desespero, cansaço e até mesmo nas vontades de desistir. Obrigada por estar na minha vida, e para sempre!

Aos meus amigos de sempre, Tiago Reis, Gustavo Martins, Emilly Aquino, Suzane Sobrinho, Rhaisa Pereira, Cleiton Bruno e a família de Cornélio (UENP): Bia, Sandra, Letícia e Gyslaine. Vocês sempre me deram força, independente de tudo, com tudo que tinham, das formas que podiam, fizeram minha caminhada melhor.

Em especial a Eloiza que foi um presente que a graduação me deu, minha companheira de comissão de formatura, minha família aqui em Londrina dividindo não só o apartamento e as contas, mas os trancos e barrancos que nos conhecemos. Obrigada por toda força que me deu quando eu mais precisei, sei que posso contar com você sempre e é recíproco, pode ter certeza de que te guardo no meu coração, estamos junto!

Um agradecimento especial aos Mestres que estiveram por toda a trajetória que alcancei da graduação até o mestrado, cada ensinamento foi e sempre será lembrado. Com certeza eu não estaria aqui sem a ajuda e apoio que recebi de cada um.

**Obrigado a todos que de alguma forma  
fizeram parte dessa trajetória!!**

“Biologia só têm sentido se nos ajudar a ver  
o mundo melhor, e se nos mostrar que o  
conhecimento sobre tudo que é vivo não está  
limitado no que é passível de fazer sentido.”  
(Maura Watan)

CAVENAGH, A. F. **Estudo citogenético em espécies de aranhas pertencentes a família Lycosidae (Arachnida, Araneae)**. 2020. 97 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

As aranhas compreendem um grupo amplamente distribuído e de grande abundância, sendo descritas atualmente cerca de 48.300 espécies agrupadas em 120 famílias, onde a maioria se encontra inserida na região Neotropical. São animais ainda pouco estudados citogeneticamente, e esta lacuna pode ser observada em Lycosidae, que possui uma ampla distribuição e diversidade de espécies. O objetivo do presente estudo foi realizar análises por meio de marcadores cromossômicos em espécies de *Lycosa* e *Trochosa*, visando contribuir para um melhor entendimento da estrutura e evolução cariotípica nestes gêneros de aranhas. Foram coletados indivíduos dentro de fragmentos do bioma Mata Atlântica, localizados em pontos não amostrados no estado do Paraná, sendo analisadas espécies de *Lycosa erythrognatha*, *L. sericovittata*, *Lycosa* gr. *nordenskjoldi* e *Trochosa* sp. Os resultados mostraram que *L. erythrognatha* e *L. sericovittata* possuem  $2n_{\text{♂}} = 22$  e um Sistema Cromossômico Sexual (SCS)  $X_1X_20$  e *Lycosa* gr. *nordenskjoldi*  $2n_{\text{♂}} = 19$  e SCS  $X0$ , todos os cromossomos com morfologia acrocêntrica. Já os indivíduos de *Trochosa* sp. do Parque Nacional de Iguaçu (PNI) tiveram  $2n_{\text{♂}} = 22$ ,  $X_1X_20$  também todos acrocêntricos e do Parque Estadual Mata dos Godoy e Reserva Biológica das Perobas (PEMG/RBP) um  $2n_{\text{♂}} = 11, X0$ , todos metacêntricos. A localização de heterocromatina foi pericentromérica em todos os cromossomos das três espécies de *Lycosa*; um indivíduo de *L. sericovittata* apresentou dois cromossomos com marcação terminal e dentro do grupo de *L. nordenskjoldi* quatro cromossomos com marcações intestinal e um terminal. Os indivíduos de *Trochosa* sp também tiveram distribuições variadas de heterocromatina pelos cromossomos assim como *L. nordenskjoldi*. Entre as espécies de *Lycosa*, todas marcações pericentroméricas foram  $CMA_3^+$ ; somente um espécime de *L. sericovittata* teve  $CMA_3^+$  terminal. Os espécimes de *Trochosa* sp não apresentaram marcações fluorescentes, a não ser em paquítenos. Os sítios de DNAr 18S foram obtidos somente em *Lycosa*, onde demonstraram variabilidade entre as espécies e as populações, relacionada à quantidade de sítios identificados e o par portador dentro das espécies. *Lycosa* gr. *nordenskjoldi* foi a espécie com mais variação, apresentando espécimes com dois, três e quatro pares, todos apresentando os sítios em região terminal, ou seja, opostas à distribuição da heterocromatina constitutiva encontrada nas três espécies. Essas alterações podem estar relacionadas à dispersão do gene associada a elementos de transposição e possíveis translocações. Com os dados de *Lycosa* neste estudo e os da literatura foi proposto um esquema evolutivo relacionando a variação cariotípica e SCS dentro do gênero. Os resultados de *Trochosa* sp mostraram um conjunto cariotípico completamente diferente entre as populações, propondo uma possível fixação deste cariótipo por meio de rearranjos cromossômicos e a ocorrência de espécies diferentes.

**Palavras-chave:** Cariótipo. FISH. Heterocromatina. Rearranjos cromossômicos.

CAVENAGH, A. F. **Cytogenetic study in species of spiders belonging to the Lycosidae family (Arachnida, Araneae)**. 2020. 97 p. Dissertation presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology - as a partial requirement for obtaining the master degree – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Spiders comprise a group widely distributed and of great abundance, with about 48,300 species currently grouped in 120 families, where the majority are located in the Neotropical region. They are still little studied cytogenetically, and this gap can be observed in Lycosidae, which has a wide distribution and diversity of species. The objective of the present study was to carry out analyzes by means of chromosomal markers in *Lycosa* and *Trochosa* species, aiming to contribute to a better understanding of the structure and karyotype evolution in these spider genera. Individuals were collected within fragments of the Atlantic Forest biome, located in non-sampled points in the state of Paraná, and species of *Lycosa erythrognatha*, *L. sericovittata*, *Lycosa* gr. *nordenskjoldi* and *Trochosa* sp. The results showed that *L. erythrognatha* and *L. sericovittata* have  $2n_{\text{♂}} = 22$  and a Sexual Chromosome System (SCS) X1X20 and *Lycosa* gr. *nordenskjoldi*  $2n_{\text{♂}} = 19$  and SCS X0, all chromosomes with acrocentric morphology. The individuals of *Trochosa* sp. from Iguaçu National Park (PNI) had  $2n_{\text{♂}} = 22$ , X1X20 also all acrocentric and from Mata dos Godoy State Park and Perobas Biological Reserve (PEMG / RBP) a  $2n_{\text{♂}} = 11$ , X0, all metacentric. The location of heterochromatin was pericentromeric in all chromosomes of the three species of *Lycosa*; one individual of *L. sericovittata* presented two chromosomes with terminal marking and within the group of *L. nordenskjoldi* four chromosomes with intestinal and one terminal marking. Individuals from *Trochosa* sp also had varied distributions of heterochromatin across chromosomes as well as *L. nordenskjoldi*. Among *Lycosa* species, all pericentromeric markings were CMA3 +; only one specimen of *L. sericovittata* had terminal CMA3 +. The specimens of *Trochosa* sp did not show fluorescent markings, except in pachytens. DNAr 18S sites were obtained only in *Lycosa*, where they showed variability between species and populations, related to the number of identified sites and the carrier pair within the species. *Lycosa* gr. *nordenskjoldi* was the species with the most variation, presenting specimens with two, three and four pairs, all presenting sites in the terminal region, that is, opposed to the distribution of the constitutive heterochromatin found in the three species. These changes may be related to the dispersion of the gene associated with transposition elements and possible translocations. With the data from *Lycosa* in this study and those from the literature, an evolutionary scheme relating the karyotype variation and SCS within the genus was proposed. The results of *Trochosa* sp showed a completely different karyotype set between populations, proposing a possible fixation of this karyotype through chromosomal rearrangements and the occurrence of different species.

**Keywords:** Karyotype; FISH; Heterochromatin; Chromosomal Rearrangements.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1** – Dados Citogenéticos em *Lycosidae* Sundevall, 1833, compilados a partir de Araujo et al., 2019. 2n= número diploide, SCS= Sistema Cromossômico Sexual, A= acrocêntrico, St= subtelocêntrico, T= telocêntrico, Sm= submetacêntrico, M= metacêntrico, S= cromossomo supranumerário – PR = Paraná; SP = São Paulo; USA = Estados Unidos da América .....27
- Tabela 2** – Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG= Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS= Parque Nacional de Superagui; UEL= Universidade Estadual de Londrina; PNIG= Parque Nacional de Ilha Grande; PNI= Parque Nacional do Iguaçu; RBP= Reserva Biológica das Perobas .....38

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Análises Citogenéticas em *Lycosa* Latreille, 1804 – Tabela adaptada de Araujo et al., 2019. 2n= número diploide, SCS= Sistema Cromossômico Sexual, CH= Heterocromatina Constitutiva, NOR= Região Organizadora de Nucléolo, FISH= Hibridização Fluorescente *in situ*, A= acrocêntrico, St= subtelocêntrico, T= telocêntrico, Sm= submetacêntrico, M= metacêntrico, S= cromossomo supranumerário – PR = Paraná; SP = São .....69
- Tabela 2** – Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG= Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS= Parque Nacional de Superagui; UEL= Universidade Estadual de Londrina; PNIG= Parque Nacional de Ilha Grande; PNI= Parque Nacional do Iguaçu .....72

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG=Parque Estadual Mata dos Godoy; PNI= Parque Nacional do Iguaçu; RBP= Reserva Biológica das Perobas .....91

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – Ilustração das divisões dentro da ordem Araneae – Baseada na Filogenia de Wheeler et al. (2016). Figura retirada do site do Museu de Zoologia Natural da Universidade Federal da Bahia (MZUFBA – BRASIL, 2009) ..... 17
- Figura 2** – Esquema demonstrativo da posição das fiandeiras. **a)** Mesothelae, posição mediana do abdome; **b)** Opisththelae, posição terminal. Figura retirada e adaptada de InbioVeritas (S.Scharf), 2012 ..... 17
- Figura 3** - a) disposição em paralelo das quelíceras; b) disposição em oposição das quelíceras. Figura retirada de FOELIX (2011) ..... 18
- Figura 4** - Padrão de olhos da família Lycosidae, conformação 4-2-2. Figura retirada de FOELIX (2011) ..... 23
- Figura 5** - Mapa do Brasil com indicação dos locais de coleta: a) Parque Nacional do Iguaçu; b) Parque Estadual Mata dos Godoy; c) Campus Universidade Estadual de Londrina; d) Parque Nacional de Superagui; e) Parque Nacional de Ilha Grande ..... 37

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Cariótipos de machos das espécies de *Lycosa* corados com Giemsa **a** *Lycosa erythrognatha*,  $2n_{\text{♂}} = 22, X_1X_20$ . **b** *Lycosa sericovittata*,  $2n_{\text{♂}} = X_1X_20$ . **c** *Lycosa nordenskjoldi*,  $2n_{\text{♂}} = 19, X0$ . Barra= 10 $\mu$ m ..... 73
- Figura 2** - Células meióticas de machos de *Lycosa* coradas com Giemsa. **a-d** *Lycosa erythrognatha*; **e-h** *Lycosa sericovittata*; **i-l** *Lycosa nordenskjoldi*. Células em paquítenos (**a,e,i**) evidenciam os cromossomos sexuais heteropcnóticos positivos. Células em diplóteno mostrando os univalentes sexuais dispostos lado a lado (**b, f**) ou como um univalente isolado (**j**) todas células apresentando quiasmas, em sua maioria terminais nos autossomos. Células em diacinese comprovam o número de bivalentes e cromossomos sexuais em cada espécie: (**c**) *L.*

*erythrognatha* e (g) *L. sericovittata* com 10 bivalentes autossômicos +  $X_1X_2O$  e (k) *L. nordenskjoldi* com 9 bivalentes autossômicos +  $XO$ . Células em metáfase II (d,h,i) mostram a migração conjunta dos cromossomos sexuais, podendo observar células com 12 e 10 cromossomos (d,h) e células com 10 e 9 cromossomos (i). As cabeças de seta indicam em (h) a célula com maior número cromossômico. Barra = 10µm.....74

**Figura 3 –** Células testiculares das três espécies de *Lycosa* submetidas a técnica de bandamento C (a, b, c) e coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (d, e, f). As setas indicam os cromossomos sexuais. Em a, b, c, metáfases mitóticas de *L. erythrognatha*, *L. sericovittata*, *L. nordenskjoldi*, respectivamente, mostrando marcações heterocromáticas pericentroméricas em todos os cromossomos. Em (b) podem ser evidenciadas algumas marcações terminais (cabeças de seta) e em (c) marcações intersticiais (asterisco). Em (d) célula em diacinese de *L. erythrognatha* com marcações pericentroméricas CMA<sub>3</sub>+. Em metáfase mitótica de *L. sericovittata* (e) com marcações CMA<sub>3</sub>+ pericentroméricas em todos os cromossomos: cabeças de setas indicam um par de cromossomos com marcação terminal. Em (f) célula em diplóteno de *L. nordenskjoldi* apresentando marcações pericentroméricas CMA<sub>3</sub> positivas em todos os cromossomos. Barra = 10µm .....75

**Figura 4 –** Cariótipos de machos de duas espécies de *Lycosa* submetidos a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda DNAr 18S (verde) e Histona H3 (vermelho). Em (a) *L. erythrognatha*, população Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e Campus Universidade Estadual de Londrina (UEL), mostrando os sítios de DNAr 18S nos pares 5 e 9; em (b) população do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) e Parque Nacional de Superagui (PNS) mostrando sítios de DNAr 18S nos pares 2 e 5; em (c) *L. sericovittata* população da UEL, com sítios de DNAr 18S nos pares 5 e 9. No box, o par 3 de Histona H3 de *L. erythrognatha* (PEMG). Barra = 10µm .....76

**Figura 5** – Cariótipos de duas populações de *L. nordenskjoldi* submetidos a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. (a) população do Parque Nacional do Superagui (PNS) com sítios de DNAr 18S nos pares 1, 3, 5 e 8, sendo que o par 3 mostra marcação em apenas um dos homólogos; (b) indivíduo da população do Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) portador dos sítios de DNAr18S nos pares 2, 3 e 5; (c) indivíduo da população PNIG com sítios ribossomais nos pares 5 e 9. Barra = .....77

**Figura 6** – Representação esquemática de uma possível evolução cariotípica dentro do gênero *Lycosa*. Os retângulos trazem os números diploide, morfologia cromossômica e quantidade de espécies portadoras destas características; os retângulos tracejados mostram os eventos responsáveis para o surgimento de cada complexo cariotípico; o sentido da seta indica de onde e para onde o evento ocorreu; e o quadrado à esquerda mostra a legenda referente às abreviações utilizadas .....78

## CAPÍTULO 2

**Figura 1** – Cariótipos de machos de *Trochosa* sp corados com Giemsa. **a** *Trochosa* sp (PNI),  $2n\♂=22, X_1X_20$ . **b** *Trochosa* sp (PEMG/RBP),  $2n\♂=11, X0$ . Barra= 10 $\mu$ m .....93

**Figura 2** – Células meióticas de machos de *Trochosa* sp. coradas com Giemsa. **a-d** *Trochosa* sp. (PNI); **e-h** *Trochosa* sp. (PEMG/RBP). Células em paquíteno (**a,e**) evidenciando os cromossomos sexuais heteropicnóticos positivos. Células em diplóteno (**b,f**) evidenciando os univalentes sexuais e a ocorrência de quiasmas nos bivalentes autossômicos. Células em metáfase I e diacinese (**c, g**) respectivamente, comprovando o número cromossômico em cada indivíduo e seus cromossomos sexuais: (**c**) *Trochosa* sp. (PNI) com 10 bivalentes autossômicos +  $X_1X_20$  dispostos lado a lado e (**g**) *Trochosa* sp. (PEMG/RBP) com 5 bivalentes autossômicos +  $X0$  como um univalente isolado. Células em anáfase II (**d, h**) mostram a migração conjunta dos cromossomos

sexuais, podendo observar células com 12 e 10 cromossomos (**d**) e células com 6 e 5 cromossomos (**h**). As cabeças de seta indicam a célula com maior número de cromossomos Barra= 10µm .....94

**Figura 3** – Meiócito de macho de *Trochosa* submetidas a técnica de bandamento C (**a,c**) e coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (**b,d**). As setas indicam os cromossomos sexuais e as cabeças de seta maiores evidenciam marcações pericentromérica e terminal, e as cabeças de setas menores mostram marcações intersticiais. Em (**a**) metáfase mitótica e (**b**) paquíteno de *Trochosa* sp (PNI): (**a**) marcações heterocromáticas pericentroméricas em todos os cromossomos, e terminais e intersticiais em alguns cromossomos. Em (**b**) podem ser evidenciadas algumas marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (asterisco). Em (**c**) metáfase mitótica e (**d**) paquíteno de *Trochosa* sp (PEMG/RBP): (**c**) marcações heterocromáticas terminais, intersticiais e pericentroméricas em alguns cromossomos. Em (**d**) marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (asterisco). Barra = 10µm .....95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRONS	Regiões Organizadoras de Nucléolo coradas com Nitrato de Prata
BSA	Albumina Soro Bovino
CMA <sub>3</sub>	Cromomicina A3
Cy3	Corante conjugado de Cianina
DAPI	4,6'- diamidino – 2'fenilindol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
PEMG	Parque Estadual Mata do Godoy
PNI	Parque Nacional do Iguaçu
PNIG	Parque Nacional de Ilha Grande
PNS	Parque Nacional do Superagui
RBP	Reserva Biológica das Perobas
RON	Região Organizadora de Nucléolo
SCS	Sistema Cromossômico Sexual
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSC	Citrato de Sódio Salino
UEL	Universidade Estadual de Londrina
2n	Número diploide

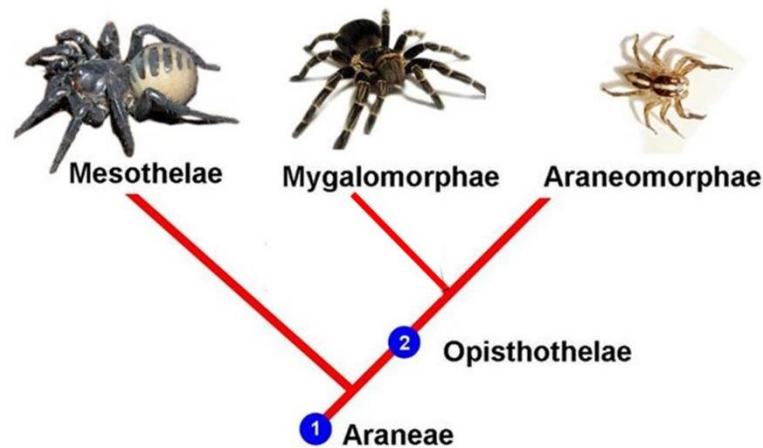
## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	21
2.1	DIVERSIDADE DE ARANHAS E A REGIÃO NEOTROPICAL .....	21
2.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS DA FAMÍLIA LYCOSIDAE .....	22
2.3	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA LYCOSIDAE .....	23
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	OBJETIVO GERAL .....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	LOCAIS DE COLETA .....	37
4.2	MATERIAL .....	37
4.3.	MÉTODOS .....	39
4.3.1.	Obtenção dos Cromossomos, Montagem das Lâminas e Coloração Convencional .....	39
4.3.2	Detecção das Regiões de Heterocromatina Constitutiva (Banda C) .....	39
4.3.3	Detecção das Regiões Ricas em Pares de Bases AT ou GC .....	40
4.3.4	Hibridização Fluorescente in Situ (FISH) .....	40
4.3.5	Observação das Lâminas .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>CAPÍTULO 1: Diversidade Cromossômica em três Espécies de Lycosa Latreille, 1804 (Araneae, Lycosidae): Insights sobre Evolução Cariotípica no Gênero</b> .....	50
	<b>RESUMO</b> .....	51
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
	<b>RESULTADOS</b> .....	55
	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56

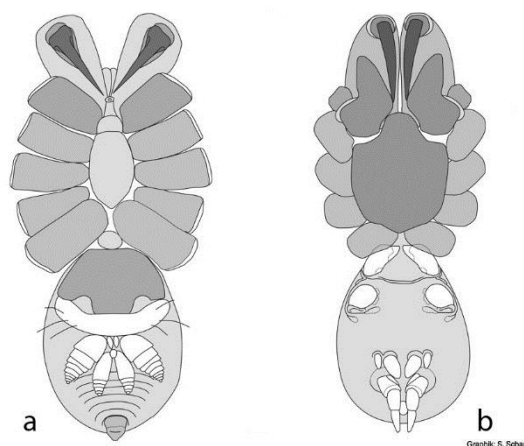
<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>CAPÍTULO 2:</b> Variação Cromossômica entre Populações de Trochosa Sp (Araneae): Ocorrência do Menor Número Diploide em Lycosidae.....	79
<b>RESUMO</b> .....	80
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	81
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	82
<b>RESULTADOS</b> .....	82
<b>DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A ordem das aranhas (Araneae), com uma ampla diversidade e abundância, está dividida em duas subordens (**Figura 1**): Mesothelae, que inclui as espécies cujas características morfológicas são mais parecidas com as dos ancestrais da ordem, como abdômen pseudo-segmentado e as fiandeiras na posição mediana do abdome (**Figura 2a**); e Opisthothelae que engloba as espécies onde esta aparente segmentação é ausente e as fiandeiras estão na posição terminal (**Figura 2b**) (WHEELER et al., 2016)

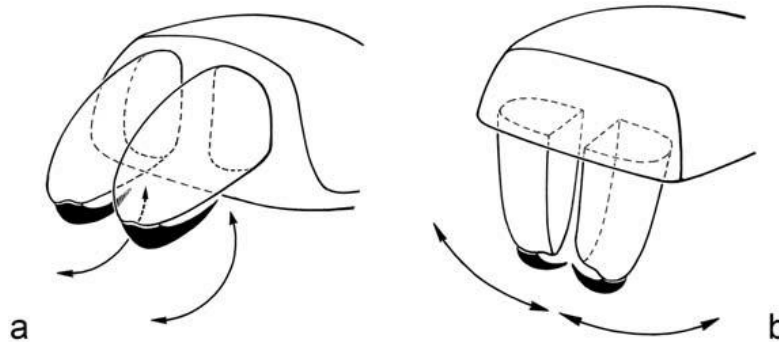


**Figura 1** – Ilustração das divisões dentro da ordem Araneae, baseada na Filogenia de Wheeler et al. (2016). Figura retirada do site do Museu de Zoologia Natural da Universidade Federal da Bahia (MZUFBA – BRAZIL,2009).



**Figura 2** - Esquema demonstrativo da posição das fiandeiras. **a)** Mesothelae, posição mediana do abdome; **b)** Opisthothelae, posição terminal. Figura retirada e adaptada de InbioVeritas (S. Scharf), 2012.

A subordem Opisthothelae está dividida em duas infra ordens: Mygalomorphae, cujas espécies são conhecidas popularmente como caranguejeiras e que tem como principal característica as quelíceras dispostas paralelamente uma à outra (**Figura 3a**); e Araneomorphae, onde a disposição das quelíceras, opostas uma à outra (**Figura 3b**), também constitui o caráter que mais facilmente a distingue (CODDINGTON; LEVI, 1991; FOELIX, 2011; WHEELER et al., 2016).



**Figura 3** – a) disposição em paralelo das quelíceras; b) disposição em oposição das quelíceras. Figura retirada de FOELIX (2011).

A infra ordem Araneomorphae engloba cerca de 90% das espécies de aranhas e está dividida em dois clados: Haplogynae, cujas espécies apresentam uma genitália feminina com morfologia mais simples e Entelegynae, que possui uma morfologia mais complexa deste órgão, compondo o grupo mais derivado e diversificado das aranhas (FOELIX, 2011).

Estimativas de estudos, como de Coddington e Levi (1991), apresentavam Araneae com uma extensa distribuição de espécies, sugerindo que apenas 20% da fauna mundial (cerca de 30.000 espécies) estava descrita e que, aproximadamente, 170.000 espécies de aranhas permaneciam desconhecidas, até aquele momento. Atualmente, taxonomistas reconhecem cerca de 48.300 espécies agrupadas em 120 famílias (WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Grande parte destas espécies estão na região Neotropical, porém, estima-se que em países como o Brasil, menos da metade das espécies de aranhas sejam conhecidas (BRESCOVIT, 1999).

O uso de informações cariotípicas no grupo ainda é recente pois, embora 74 das 120 famílias possuam dados deste tipo, apenas 868 espécies foram analisadas, isto é 1,75 % do total de espécies de aranhas descritas (ARAUJO et al., 2020), o que evidencia uma enorme lacuna no conhecimento citogenético desses animais. Ainda

assim, os estudos já existentes na literatura auxiliam na compreensão da evolução do cariótipo em aranhas, além de revelar características descritivas importantes para cada novo clado analisado (ARAUJO et al., 2020; WORLD SPIDER CATALOG, 2020).

As informações já disponíveis mostram um número diploide bem diversificado em Araneae, variando de  $2n♂ = 5$  em *Afrilobus* sp. (Orsolobidae) a  $2n♂ = 152$  em *Caponia natalenses* (Caponiidae) (O. Pickard-Cambridge, 1874) (ARAUJO et al., 2020; KRÁL et al., 2019). Este grupo ainda apresenta uma ampla variação no sistema cromossômico sexual (SCS), o qual pode variar do tipo  $X_nY_n/X_nX_n$  a  $X_n0/X_nX_n$ , com maior frequência de  $X_1X_20♂$  (ARAUJO et al., 2020). Levando em consideração a morfologia dos cromossomos, são comumente encontrados meta/submetacêntrico em clados basais de Araneae, tal como em espécies de Mygalomorphae (ŘEZÁČ et al., 2006) e cromossomos telocêntrico/acrocêntrico nas espécies derivadas, tal como observado em Entelegynae, o que indica que a morfologia cromossômica encontrada em Mygalomorphae pode ser um caráter ancestral do cariótipo das aranhas (KRÁL et al., 2013).

Segundo Araujo et al. (2012), Entelegynae é o grupo mais amplamente estudado em relação às características cromossômicas, sendo o mais diversificado na infra ordem Araneomorphae. Dentre as superfamílias presentes em Entelegynae, Lycosoidea é uma das mais representativas em número de espécies, abrigando as famílias Ctenidae, Lycosidae, Oxyopidae, Pisauridae, Psechridae, Thomisidae e Trechaleidae, categorizadas assim por meio de análises de caracteres baseados em morfologia, comportamento e sequências de DNA (POLOTOW et al., 2015; WHEELER et al., 2016). Essas famílias somam um total de 198 espécies que já foram analisadas citogeneticamente, apresentando o cariótipo  $2n=28, X_1X_20$  como o mais frequente, exceto em Oxyopidae e Thomisidae, o que pode ter relação com o baixo número de espécies ainda analisadas (ARAUJO et al., 2020).

Das famílias citadas anteriormente, Lycosidae se destaca devido ao grande número de espécies e sua ampla distribuição pelo planeta (FOELIX, 2011). Para que a fauna de aranhas de Lycosidae seja melhor caracterizada citogeneticamente na região Neotropical, é essencial uma ampliação dos locais amostrados e a utilização de técnicas de bandeamento cromossômico, como banda C e coloração por fluorocromos; além de análises do comportamento de sequencias de DNA repetitivo pela técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), que podem auxiliar na

detecção de possíveis rearranjos no cariótipo que venham ocorrendo ao longo do seu processo evolutivo.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido buscando ampliar os conhecimentos citogenéticos para diferentes espécies de *Lycosa* Latreille, 1804 e uma espécie de *Trochosa* C. L. Koch, 1847. As informações no trabalho são de grande relevância para o grupo das aranhas, mostrando novas descobertas na morfologia cromossômica e principalmente por mostrar análises de bandamento cromossômico inéditas nos gêneros, como a FISH com sondas de DNA repetitivo, identificando possíveis relações evolutivas entre as espécies.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DIVERSIDADE DE ARANHAS E A REGIÃO NEOTROPICAL

A região Neotropical (que se estende do México Central ao sul do Brasil) é conhecida por possuir uma vasta diversidade tanto de flora quanto de fauna, estando inclusa nessa região, sete dos 35 *hotspots* de biodiversidade do mundo (CONSERVANCY, 2005; TUNDISI; TUNDISI, 2008; WILLIAMS et al., 2011). Dentro desta grande área são encontradas as aranhas, com uma alta distribuição e variabilidade de espécies. Entretanto, essa região apesar de representativa ainda é pouco estudada, muitas vezes devido a áreas de difícil acesso (o que acarreta a falta de identificação de novas espécies), levando a lacunas relacionadas à manutenção de biodiversidade e ao conhecimento acerca dos aspectos evolutivos e ecológicos das espécies (ANTONELLI; SANMARTIN, 2011; TINOCO et al., 2015).

Em um levantamento geral de distribuição das aranhas, Brescovit, Oliveira e Santos (2011) relataram uma composição na região Neotropical de 11.280 espécies, até aquele momento. Ou seja, esta área engloba mais de 23% do total das espécies já descritas mundialmente, sendo o Brasil o país que abriga a maior diversidade, incluindo espécies da família Lycosidae, como *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836 uma das espécies mais amplamente distribuídas no Brasil (WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Neste contexto, algumas espécies de Lycosidae vem sendo utilizadas como organismo modelo em relações ecológicas e de comportamento (STRATTON; UETZ, 1983; HOEFLER et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2010; WILDER; RYPSTRA, 2010); no controle das comunidades terrestres através da predação; em estudos da composição do veneno (ZHANG et al., 2010), examinando os transcritos expressos por essas glândulas e desenvolvendo marcadores; além de outras áreas de estudo. Porém, sua organização taxonômica ainda não está bem definida, como o gênero *Lycosa*, considerado um depósito de espécies que não se enquadram em outras alocações, tornando-o assim polifilético (MURPHY et al., 2006).

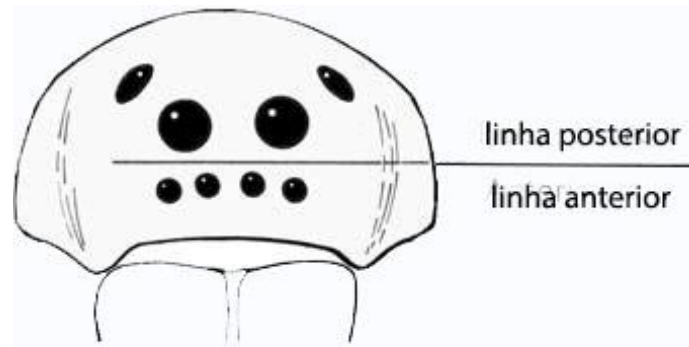
### 2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA FAMÍLIA LYCOSIDAE

Segundo Wheeler et al. (2016), Lycosoidea abriga atualmente sete famílias, Ctenidae, Lycosidae, Oxyopidae, Pisauridae, Psecridae, Thomisidae e Trechaleidae que, juntas, representam 6.117 espécies. Essas famílias possuem, aproximadamente,

13% das espécies de aranhas descritas taxonomicamente e 23% das espécies descritas citogeneticamente (ARAUJO et al., 2020; WORLD SPIDER CATALOG, 2020). Das sete famílias desse grupo, Lycosidae é a mais numerosa em espécies e é uma das mais abrangentes no que diz respeito à dispersão em nível global, com mais de 2.400 espécies e 125 gêneros (WORLD SPIDER CATALOG, 2020).

Lycosidae ocorre nos mais variados lugares e está praticamente em todos os habitats terrestres, conseguindo colonizar os lugares mais improváveis; são numerosas em ambientes de savana, frequentemente encontradas em agroecossistemas e ambientes antrópicos como jardins, caçando e sendo mais ativas à noite, comumente apresentando aspecto ágil (EDWARDS; THORNTON, 2001; MUNGUÍA, 2013). Esta família apresenta aranhas de pequeno a grande porte, podendo variar de 3 a 30 mm no comprimento do corpo onde, frequentemente, as fêmeas são maiores que os machos; podem ser espécies errantes encontradas no solo, arbustos e árvores ou espécies mais sedentárias, que utilizam teias como método de captura de presas, como as espécies do gênero *Aglaoctenus* Tullgren, 1905 (FOELIX, 2011).

As fêmeas de Lycosidae são caracterizadas por carregarem sua ooteca no abdômen de modo que, logo após serem liberados, os filhotes são levados sobre a região dorsal por um curto período. Por via de regra, os filhotes nascidos durante qualquer estação passam o inverno seguinte na condição juvenil, não atingindo a maturidade até depois do verão ou no final da primavera (MUNGUÍA, 2013). Algumas das principais características deste grupo de aranhas incluem: padrão de olhos do tipo 4-2-2 (**Figura 4**); construção de abrigos subterrâneos, podendo também fazer abrigos paralelos à superfície; algumas espécies podem produzir teias em forma de funil; durante a captura de presas, tendem a reagir principalmente às vibrações causadas pela batida das asas ou pelo padrão característico de caminhada dos insetos (FOELIX, 2011).



**Figura 4** - Padrão de olhos da família Lycosidae, conformação 4-2-2. Figura retirada e adaptada de FOELIX (2011).

De acordo com Foelix (2011), a morfologia e comportamento de Lycosidae são características importantes para que ela possa ser diferenciada de outras famílias, incluindo: variação de cores sobre o cefalotórax e abdômen, a qual forma um desenho parecido com uma seta, algumas mais escuras que as outras; utilização da técnica de ficar à espreita para capturar sua presa (motivo pelo qual são popularmente chamadas de aranha lobo) pois, apesar de possuírem as glândulas de seda, não confeccionam teias para esta finalidade. Ainda segundo Foelix (2011), Lycosoidea tem uma ampla variedade de espécies de aranhas, tanto de ambiente aquático como terrestre, e estudos baseados em morfologia e comportamento vem trazendo alguns resultados contraditórios em relação à sistemática do grupo.

Um dos caracteres mais importantes para classificação das famílias de aranhas são os olhos, principalmente seu tamanho, posicionamento, quantidade e pela posse do *tapetum*, membrana posicionada no globo ocular que faz com que os animais tenham uma melhor visão em baixa luminosidade permitindo, também, que os olhos reflitam ao contato direto com a luz, o que auxilia sua identificação na coleta. No caso de Lycosoidea essa membrana é em forma de grade, entretanto, não é uma característica exclusiva dessa superfamília. Por conta de itens como esse, que ocorrem em mais de um grupo, estudos moleculares têm sido realizados para melhor embasar sua divisão e caracterização (FOELIX, 2011).

### 2.3 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA LYCOSIDAE

Estudos citogenéticos vem sendo desenvolvidos em espécies de Lycosidae, desde 1905 com Montgomery, que estudou *Gladicosa pulchra* (Keyserling, 1877),

(descrita inicialmente como *Lycosa insopita*), trazendo análises de espermatogênese que auxiliaram nas primeiras definições do número diploide da espécie, além da observação de cromossomos supranumerários.

Lycosidae é uma das famílias mais estudadas citogeneticamente, apresentando informações já publicadas para 23 gêneros e 120 espécies, embora isso corresponda a apenas 5% do total de espécies descritas na família. As espécies analisadas se concentram no continente asiático, como se pode observar na **Tabela 1**, com dados cariotípicos para apenas quatro espécies brasileiras, mostrando uma enorme lacuna para a região Neotropical.

Até o momento, as espécies de Lycosidae apresentaram número diploide que varia de 18 a 30 cromossomos, tendo predominância de  $2n_{\text{♂}} = 28$ , com o sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo  $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$  observado, inclusive, em espécies de *Lycosa* e *Trochosa*. Esse tipo de sistema foi encontrado em 94% das espécies de Lycosidae analisadas (ARAUJO et al., 2020; WORLD SPIDER CATALOG, 2020), sendo considerado como um traço ancestral em aranhas (ARAUJO et al., 2016).

Embora esse seja o SCS mais comum, observam-se outras variações como  $X0$  em *Lycosa nordenskjoldi* Tullgren, 1905 (ARAUJO et al., 2015),  $X_1X_2X_30$  em *Lycosa* sp. (grupo *thorelli*) e  $X_1X_2Y$  em *Lycosa* sp., como relacionado na **Tabela 1**. Apesar dessas variações, tanto no número diploide quanto no SCS, a morfologia cromossômica é quase exclusivamente acro/telocêntrica em todas as espécies (ARAUJO et al., 2020, **Tabela 1**).

Alguns estudos, como de Navia et al. (2006) e Král et al. (2011), mostram possíveis fusões cromossômicas dentro de espécies da família, como *Lycosa* sp. e *Pardosa morosa* (L. Koch, 1870), podendo ocorrer tanto em cromossomos sexuais quanto nos autossomos, mudando assim a morfologia ou até mesmo o tipo de SCS (**Tabela 1**). Assim, podem ocorrer cromossomos do tipo subtlocêntrico/metacêntrico em algumas espécies, estando presentes junto ao conjunto de acrocêntricos (autossômicos e sexuais) como em *Evippa praelongipes* (O.Pickard-Cambridge, 1871) (GORLOVA et al., 1997), *Lycosa* sp. (NAVIA et al., 2006) e *Arctosa alpigena* (Doleschall, 1852) ou só no cromossomo sexual como no caso de *Lycosa* sp. (gr. *malitiosa*) mostrando um conjunto de onze bivalentes telocêntricos e um sexual metacêntrico (POSTIGLONI; BRUM-ZORRILLA, 1981).

Todas as espécies do gênero *Arctosa*, analisadas por Dolejš et al. (2011), apresentaram um  $2n=28$  equivalente aos estudos anteriormente realizados para as mesmas espécies, exceto *A. alpigena* (Doleschall, 1852) e *A. leopardus* (Sundevall, 1833), ambas do trabalho de Hackman (1948), que apresentaram  $2n=26$ . Além disso, *A. alpigena* mostrou dois cromossomos subtelocêntricos no cariótipo.

Diante das variações observadas entre as espécies de Lycosidae, novas técnicas citogenéticas foram sendo utilizadas para uma análise mais aprofundada da estrutura cromossômica no grupo. A técnica de bandamento C, para observação da heterocromatina, foi utilizada pela primeira vez por Brum-Zorrilla e Cazenave (1974) em *Schizocosa malitiosa* (Tullgren, 1905) (também classificada anteriormente no gênero *Lycosa*). Até o momento, mais 12 espécies da família foram analisadas (Brum-Zorrilla; Cazenave, 1974; Brum-Zorrilla; Postiglioni, 1980; Zhenling et al., 1996, 1997a; Gorlova et al, 1997; Yu et al., 1998a; Chemisquy et al., 2008; Dolejš et al., 2011; Král et al, 2011; Kořínková; Král, 2013), e todas mostraram blocos heterocromáticos pequenos e médios em localização pericentromérica, semelhante ao padrão proposto como ancestral para Araneomorphae, por Rodríguez-Gil et al (2007). Entretanto, o estudo de Kořínková e Král (2013) com *Pardosa wagleri* (Hahn, 1822), relata um par com marcação no braço longo.

Chemisquy et al. (2008) desenvolveram um trabalho com *Lycosa erythrognatha* Lucas 1836, utilizando banda C e fluorocromos base específicos, cromomicina  $A_3$  (CMA<sub>3</sub>) e DAPI, para analisar a quantidade, distribuição e composição da heterocromatina. Os autores observaram na espécie heterocromatina pericentromérica rica em pares de base GC, sendo o único trabalho, até o momento, com dados de fluorocromos na família.

Em 1983, Wise estudando *Tigrosa georgicola* (Walckenaer, 1837), (descrita inicialmente como *Allocosa georgicola* (Walckenaer, 1837), detectou regiões organizadoras de nucléolo com impregnação de nitrato de prata (AgRONS), evidenciadas em dois pares cromossômicos autossômicos. Mais recentemente, Dolejš et al (2011) analisando as espécies: *Arctosa alpigena lamperti* Dahl, 1908, *Arctosa lutetiana* (Simon, 1876), *Xerolycosa miniata* (C.L.Koch, 1834), *X. nemoralis* (Westring, 1861), puderam observar que essas regiões estavam na parte distal, e variando a posição dos cromossomos portadores no cariótipo. Das seis espécies na família, que possuem dados relacionados a RON, cinco delas apresentam os mesmos padrões.

Apesar dos estudos cariotípicos em Lycosidae virem aumentando, como pode ser observado na **Tabela 1**, encontra-se somente um trabalho com a utilização da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), realizada por Forman et al. (2013), na espécie *Wadicosa fidelis* (O. Pickard-Cambridge, 1874). Os autores utilizaram tanto a impregnação por nitrato de prata quanto a sonda de DNAr 18S e observaram uma variabilidade no número de RONS: com a primeira técnica encontraram seis pares portadores da região e com a sonda ribossômica de sete a nove pares, além da presença de heterozigotos, implicando numa rápida dispersão destas regiões no genoma da espécie causada, segundo os autores, por recombinação ou hibridização entre os indivíduos.

**Tabela 1** – Dados Citogenéticos em Lycosidae Sundevall, 1833, compilados a partir de Araujo et al., 2020. 2n= número diploide, SCS= Sistema Cromossômico Sexual, A= acrocêntrico, St= subtelocêntrico, T= telocêntrico, Sm= submetacêntrico, M= metacêntrico, S= cromossomo supranumerário – PR = Paraná; SP = São Paulo; USA = Estados Unidos da América

<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>SCS</b>	<b>Morfologia Cromossômica</b>	<b>Coleta Local/País</b>	<b>Referências</b>
<i>Alopecosa aculeata</i> (Clerck, 1757)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinque e Grankulla / Finlândia	Hackman (1948)
<i>Alopecosa albofasciata</i> (Brullé, 1832)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Nahal Oren – Monte Carmel/ Israel	Gorlova et al. (1997)
<i>Alopecosa pulverulenta</i> (Clerck, 1757)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinque/ Finlândia	Hackman (1948)
<i>Anomalomma harishi</i> Dyal, 1935	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
<i>Anomalomma</i> sp.	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia	Sharma et al. (1958)
<i>Arctosa alpigena</i> (Doleschall, 1852)	26 30 ♀	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A 28A+2St	Täcktom/Finlândia Sportgastein/Austria	Hackman (1948) Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa alpigena lamperti</i> Dhal, 1908	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+2St+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Modrava/República Checa	Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa cinerea</i> (Fabricius, 1777)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Tušť/ República Checa	Dolejš et al. (2011)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Adıyaman/Turquia	Kumbıçak et al. (2011)
<i>Arctosa figurata</i> (Simon, 1876)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Srbsko/República Checa	Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa leopardus</i> (Sundevall, 1833)	26 28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A 26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Tvärminne /Finlândia Žleby/República Checa	Hackman (1948) Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa lutetiana</i> (Simon, 1876)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Srbsko/ República Checa	Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa maculata</i> (Hahn, 1822)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Žilina/República Checa	Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa mulani</i> (Dyal, 1935)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia	Sharma et al. (1958)

<i>Arctosa perita</i> (Latreille, 1799)	12 ♀ 28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----- 26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Nizip, Burj Khalifa/Turquia Mušov/República Checa	Akan et al. (2005) Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa renidescens</i> Buchar & Thaler, 1995	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Patsch/Austria	Dolejš et al. (2011)
<i>Arctosa</i> sp.	28 28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----- 26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia Índia	Mittal (1960) Mittal (1963)
<i>Crocodilosa leucostigma</i> (Simon, 1885)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Draposa lyrivulva</i> (Bosenberg & Strand, 1906)	28 28 24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A 26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A -----	Calcutá/Índia Índia Allahabad/Índia	Bole-Gowda (1958) Mittal (1963) Srivastava; Shukla (1986)
<i>Draposa oakleyi</i> (Gravely, 1924)	28 26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A -----	Hoshiarpur/Índia Allahabad/Índia	Sharma et al. (1958) Srivastava; Shukla (1986)
<i>Evippa praelongipes</i> (O. Pickard-Cambridge, 1871)	26 26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A 23A+1M+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia Deserto Negev/Israel	Sharma et al. (1958) Gorlova et al. (1997)
<i>Gradicosa pulchra</i> (Keyserling, 1877)	26+2S	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Austin, Texas/USA	Montgomery (1905)
<i>Hippasa agelenoides</i> (Simon, 1884)	28 24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A 22A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia Índia	Bole-Gowda (1958) Sharma et al. (1958)
<i>Hippasa holmerae</i> Thorell, 1895	26	-----	-----	-----	Bugayong et al. (1999)
<i>Hippasa madhuae</i> Tikader & Malhotra, 1980	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Parida et al. (1986)
<i>Hippasa olivacea</i> (Thorell, 1887)	28 28 28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A ----- -----	Pond, Gopalpur, Cuttack/ Índia Gopalpur, Cuttack/Índia	Parida; Sharma (1987b) Parida; Sharma (1987a) Sharma; Parida (1987)

<i>Hippasa pisaurina</i> Pocock, 1900	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1960)
	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Hippasa</i> sp.	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia Pipili, Puri/ Índia	Parida; Sharma (1987a) Sharma; Parida (1987)
<i>Hogna himalayensis</i> (Gravely, 1924)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Hogna sternalis</i> (Bertkau, 1880)	19	X0	18T+XT	Miranda, (MS)/ Brasil	Araujo et al. (2015a)
<i>Hygrolycosa rubrofasciata</i> (Ohlert, 1865)	20	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	18A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria)/ Rússia	Gorlov et al. (1995)
<i>Lycosa barnesi</i> Gravely, 1924	27	X	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Lycosa bistriata</i> Gravely, 1924	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
<i>Lycosa carmichaelli</i> Gravely, 1924	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mitta (1963)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Lycosa chaperi</i> Simon, 1885	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Lycosa coelestis</i> L.Koch, 1878	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Nishihakushima/ Japão	Suzuki (1954)
<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	-----	Diaz; Saez (1966)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Buenos Aires, Entre Ríos, Mendoza, Misiones/ Argentina	Chemisquy et al. (2008)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Rio Claro, Boituva, Guarulhos (SP)/ Brasil	Araujo et al. (2015a)

<i>Lycosa madani</i> Pocock, 1901	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Lycosa nigrotibialis</i> Simon, 1884	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Lycosa nordenskjoldi</i> Tullgren, 1905	19	X0	18A+XA	----	Diaz; Saez (1966)
	19	X0	18T+XT	Altônia (PR)/ Brasil	Araujo et al. (2015a)
<i>Lycosa pampeana</i> Holmberg, 1876	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Buenos Aires/ Argentina	Chemisquy et al. (2008)
<i>Lycosa phipsoni</i> Pocock, 1899	-----	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
<i>Lycosa praegrandis</i> C.L. Koch, 1836	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Deserto Negev/ Israel	Gorlova et al. (1997)
<i>Lycosa sericovittata</i> Mello- Leitão, 1939	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	São Roque, Tietê (SP)	Araujo et al. (2015a)
	26	-----	26T	/Brasil	
<i>Lycosa tarantula</i> (Linnaeus, 1758)	18	-----	-----	Nizip,Burj Khalifa/Turquia	Akan et al. (2005)
<i>Lycosa thorelli</i> (Keyserling, 1877)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Postiglioni (1980) Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Montevidéo/Uruguai	
<i>Lycosa</i> sp.	20-24	-----	----	França	Carnoy (1885) Chickering; Hard (1935)
	-----	X	----	-----	
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Iwakuni/Japão	Suzuki (1954)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia	Sharma et al. (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	----	Sokolov (1960)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Postiglioni (1980) Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Montividéo/Uruguai	

	18	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Allahabad/Índia	
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Saheed Nagar,	Parida; Sharma (1987 a,b)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Bhubaneswar/ Índia	
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Índia	Sharma; Parida (1987)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Bhubaneswar/Índia	
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Gopalpur, Cuttack/Índia	
	21	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	16T+2St+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> M/Sm+YT	Bolognesi/Peru	Navia et al. (2006)
<i>Lycosa</i> sp. (grupo <i>malitiosa</i> )	23	X0	22T+XM	Canelones/Uruguai	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
<i>Lycosa</i> sp. (grupo <i>thorelli</i> )	23	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> T	Montividéu/Uruguai	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
<i>Margonia himalayensis</i> (Gravely, 1924)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
<i>Ocyale kumari</i> Dyal, 1935	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia	Sharma et al. (1958)
<i>Pardosa agrestis</i> (Westring, 1861)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria)/ Rússia	Gorlov et al. (1995)
<i>Pardosa agricola</i> (Thorell, 1856)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinki e Tvärminne /Finlândia	Hackman (1948)
<i>Pardosa alacris</i> (C.L. Koch, 1833)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Kamenice/República Checa	Kumbıçak et al. (2009)
<i>Pardosa amentata</i> (Clerck, 1757)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinki e Tvärminne /Finlândia	Hackman (1948)
<i>Pardosa astrigera</i> L. Koch, 1878	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	-----	Sokolov (1960)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hiroshima,Iwakuni/ Japão Toquio/Japão	Suzuki (1954)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Japão	Matsumoto (1977)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T		Kageyama et al. (1978)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	China	Zhenling et al. (1996)
<i>Pardosa basiri</i> (Dyal, 1935)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1960)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)

<i>Pardosa bifasciata</i> (C.L. Koch, 1834)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Gaziantep, Kirsehir, Adiyaman/ Turquia	Kumbiçak et al. (2011)
<i>Pardosa birmanica</i> Simon, 1884	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Tura, Tezpur, Shiilong/Índia	Datta; Chatterjee (1983)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Pond, Kendrapara,	Parida; Sharma (1987b)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Cuttack/ Índia	
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Índia	Parida; Sharma (1987a)
<i>Pardosa fletcheri</i> (Gravely, 1924)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Kendrapara, Cuttack/Índia	Sharma; Parida (1987)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Tura, Tezpur/ Índia	Datta; Chatterjee (1989)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Pardosa laura</i> Karsch, 1879	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Japão	Kageyama et al. (1978)
<i>Pardosa lugubris</i> (Walckenaer, 1802)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria)/ Rússia	Gorlov et al. (1995)
<i>Pardosa morosa</i> (L. Koch, 1870)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Svatonovice/ República Checa	Král et al. (2011)
	25	-----	24A+1M	Kezmarok/ Eslováquia	
<i>Pardosa palustris</i> (Linnaeus, 1758)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinque e Tvärminne /Finlândia	Hackman (1948)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+2M+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A		
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria)/ Rússia	Gorlov et al. (1995)
<i>Pardosa plumipes</i> (Thorell, 1875)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria)/ Rússia	Gorlov at al. (1995)
<i>Pardosa pseudoannulata</i> (Bosenberg & Strand, 1906)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Mitaki/Japão	Suzuki (1954)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Japão	Kageyama et al. (1978)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Pardosa saltans</i> Topfer-Hofmann, 2000	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Kamenice/República Checa	Kumbiçak et al. (2009)

<i>Pardosa sumatrana</i> (Thorell, 1890)	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Sharma (1961)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Pardosa wagleri</i> (Hahn, 1822)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	---	Kořínková; Král (2013)
<i>Pardosa</i> sp.	----	X	-----	---	Chickering; Hard (1935)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Índia	Sharma; Gupta (1956)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Bangalore/Índia	Bole-Gowda (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1960)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Pirata piraticus</i> (Clerck, 1757)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinque e Tvärminne /Finlândia	Hackman (1948)
	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	----	Yu et al. (1998a)
<i>Pirata subpiraticus</i> (Bosenberg & Strand, 1906)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Japão	Kageyama et al. (1978)
	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	----	Yu et al. (1998b)
<i>Pirata</i> sp.	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	----	Sokolov (1960)
<i>Piratula latitans</i> (Blackwall, 1841)	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Piratula piratoides</i> (Bosenberg & Strand, 1906)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	-----	Zhenling et al. (1997a)
<i>Piratula procurva</i> (Bosenberg & Strand, 1906)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Japão	Kageyama et al. (1978)
<i>Piratula uliginosa</i> (Thorell, 1856)	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Tvärminne /Finlândia	Hackman (1948)
<i>Rabidososa rabida</i> (Walckenaer, 1837)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Starkville (Mississippi) /USA	Wise (1983)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Texas/USA	Tugmon et al. (1990)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Mississippi/USA	Wise; Taylor (1995)
<i>Schizocosa bilineata</i> (Emerton, 1885)	----	X	-----	----	Chickering; Hard (1935)
<i>Schizocosa communis</i> (Emerton, 1885)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	----	Painter (1914)

<i>Schizocosa crassipes</i> (Walckenaer, 1837)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Carolina do Norte/USA	Hard (1939)
<i>Schizocosa malitiosa</i> (Tullgren, 1905)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Cazenave (1974)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	El Pinar/Uruguai	Benavente; Wettstein (1977)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Postiglioni (1980)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Entre Ríos, Corrientes, Córdoba/Argentina	Chemisquy et al. (2008)
<i>Schizocosa ocreata</i> (Hentz, 1844)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Illinois/USA	Stratton (1997)
<i>Schizocosa rovneri</i> Uetz & Dondale, 1979	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Illinois/USA	Stratton (1997)
<i>Schizocosa stridulans</i> Stratton, 1984	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Illinois/USA	Stratton (1997)
<i>Schizocosa</i> sp.	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1960)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Tigrosa georgicola</i> (Walckenaer, 1837)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24T+2A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Starkville (Mississippi) /USA	Wise (1983)
<i>Tigrosa helluo</i> (Walckenaer, 1837)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Mississippi/USA	Wise; Taylor (1995)
<i>Trochosa punctipes</i> (Gravely, 1924)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Sharma (1961)
<i>Trochosa rucicola</i> (De Geer, 1778)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Tvärminne e Sibbo /Finlândia	Hackman (1948)
	20	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Kahramanmaraş/ Turquia	Tasdemir et al. (2012)
<i>Trochosa spinipalpis</i> (F.O.Pickard-Cambridge, 1895)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Tuusula/Finlândia	Hackman (1948)
				----	Zhenling et al. (1997b)
<i>Venonia</i> sp.	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)

<i>Wadicosa fidelis</i> (O.Pickard-Cambridge, 1872)	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Ilhas Canárias/ Israel	Forman et al. (2013)
<i>Wadicosa quadrifera</i> (Gravely, 1924)	27	X	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Xerolycosa miniata</i> (C.L.Koch, 1834)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Tvänninne/Finlândia	Hackman (1948)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria) / Rússia	Gorlov et al. (1995)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Brandýs, Tušť, Praha/ República Checa	Dolejš et al. (2011)
<i>Xerolycosa nemoralis</i> (Westring, 1861)	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Helsinque/Finlândia	Hackman (1948)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Novosibirsk (Sibéria) / Rússia	Gorlov et al. (1995)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Teptín/ República Checa	Dolejš et al. (2011)

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo contribuir para um melhor entendimento da estrutura e evolução cariotípica no grupo Lycosidae, analisando citogeneticamente três espécies do gênero *Lycosa* e uma do gênero *Trochosa*.

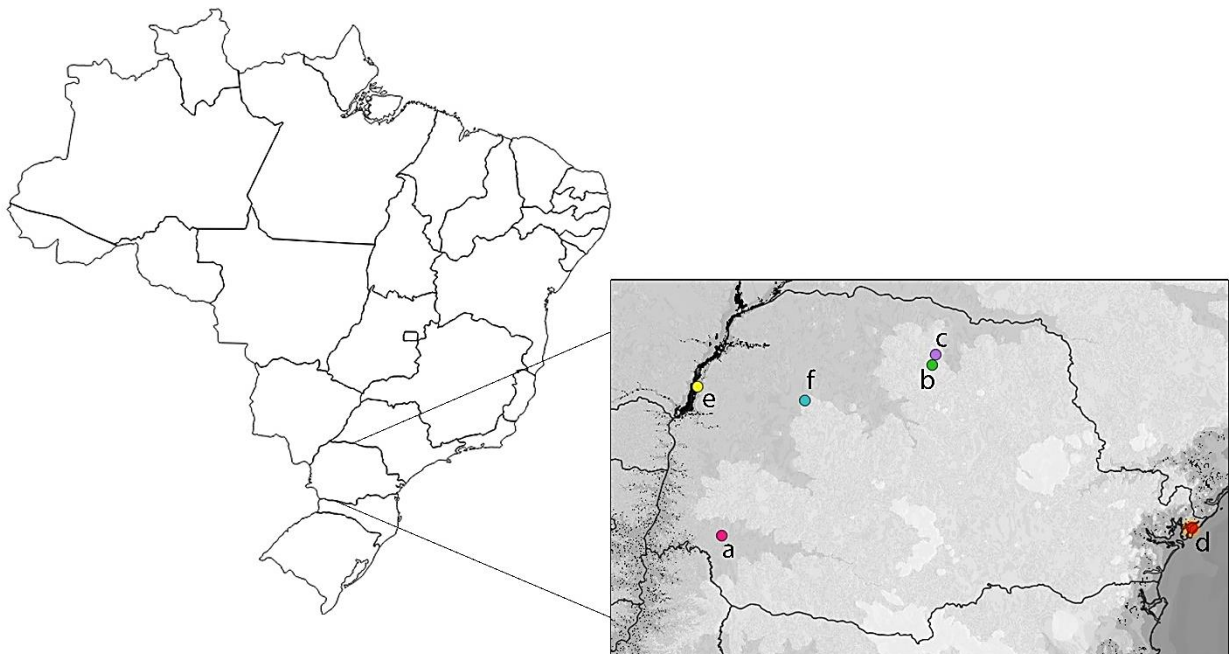
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o cariótipo das espécies coletadas, definindo seu número diploide, morfologia cromossômica e sistema cromossômico sexual;
- Determinar o padrão de distribuição de heterocromatina;
- Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT;
- Localizar os sítios de DNAr 18S e Histona H3;
- Comparar os dados obtidos com a literatura, visando um melhor entendimento da estrutura e evolução cariotípica de Lycosidae

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAIS DE COLETA

As coletas foram realizadas em seis pontos no estado do Paraná (**Figura 5; Tabela 2**): Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL), ambos em Londrina, Parque Nacional de Superagui (PNS), localizado no litoral norte do Paraná, em Guaraqueçaba, Parque Nacional do Iguaçu (PNI) localizado extremo oeste Paranaense em Foz do Iguaçu, Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) entre Icaraíma e Porto Camargo e na Reserva Biológica das Perobas próxima a cidade de Tuneiras do Oeste.



**Figura 5** – Mapa do Brasil com indicação dos locais de coleta: **a)** Parque Nacional do Iguaçu; **b)** Parque Estadual Mata dos Godoy; **c)** Campus Universidade Estadual de Londrina; **d)** Parque Nacional de Superagui; **e)** Parque Nacional de Ilha Grande; **f)** Reserva Biológica das Perobas.

### 4.2 MATERIAL

Neste estudo foram analisadas quatro espécies de Lycosidae, três pertencentes ao gênero *Lycosa*: *Lycosa erythrognatha*, *Lycosa sericovittata* Mello-Leitão, 1939, *Lycosa* (grupo *nordenskjoldi*); e uma do gênero *Trochosa*. Os espécimes foram coletados por busca ativa, utilizando como material de coleta uma lanterna de cabeça (as coletas foram noturnas, período de maior atividade desses animais), uma pinça de trinta centímetros (utilizada para manusear com segurança os espécimes) e

sacos plásticos de 20 cm de comprimento por 15 cm de largura onde os animais foram mantidos, até o momento da retirada das gônadas.

Foram utilizados testículos de aranhas machos, jovens e adultos e os espécimes armazenados em álcool 70% e enviados ao Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curador A. D. Brescovit), onde foram devidamente identificados e depositados na coleção. As análises citogenéticas foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina/PR, no Laboratório de Citogenética Animal (LACA).

**Tabela 2** – Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG=Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS=Parque Nacional de Superagui; UEL= Universidade Estadual de Londrina; PNIG=Parque Nacional de Ilha Grande; PNI = Parque Nacional do Iguaçu; RBP = Reserva Biológica das Perobas.

<b>Espécies</b>	<b>Amostras (♂ / ♀)</b>	<b>Local de Coleta</b>
<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	3	PEMG – Londrina, PR (23°26'22.92"S 51°14'26.66"O)
	15	PNS – Guaraqueçaba, PR (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)
	4	UEL – Londrina, PR (23°19'27.07"S 51°12'5.78"O)
	4	PNI – Foz do Iguaçu, PR (25°35'17.48"S 54°28'22.09"O)
<i>Lycosa</i> (gr. <i>nordenskjoldi</i> )	3	PNS – Guaraqueçaba, PR (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)
	4	PNIG - Icaraíma/Porto Camargo-PR (43° 22' 01,00"S 73° 46' 25,40"O)
<i>Lycosa sericovittata</i> Mello-Leitão, 1939	7	UEL – Londrina, PR (23°19'27.07"S 51°12'5.78"O)
<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	23	PEMG – Londrina, PR (23°26'22.92"S 51°14'26.66"O)
	8	PNI – Foz do Iguaçu, PR (25°35'17.48"S 54°28'22.09"O)
	6	RBP – Tuneiras do Oeste, PR (23°51'30.79"S 52°45'31.28"O)

### 4.3. MÉTODOS

#### 4.3.1. Obtenção dos Cromossomos, Montagem das Lâminas e Coloração Convencional

A obtenção de cromossomos seguiu o proposto por Araujo et al. (2008), com algumas modificações: em laboratório, os espécimes foram anestesiados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , removidas as gônadas em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,72g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em 1 litro de água destilada). Em seguida, foram colocadas em uma solução de colchicina 0,16% preparada com solução fisiológica para insetos, por um período de 1 hora. Foi adicionado um volume de KCL 0,075M, equivalente ao mesmo de colchicina, para atuar como solução hipotônica, durante 30 minutos. Logo após o material foi transferido para um tubo com fixador (metanol – ácido acético na proporção de 3:1) durante 1 hora.

Para confecção das lâminas, algumas porções do material foram colocadas em lâminas de vidro, juntamente com uma gota de solução de ácido acético a 60% e, com o auxílio de um pequeno bastão de metal, foram maceradas até obter uma suspensão celular. Logo após, as lâminas foram secas em placa de metal, à  $40^{\circ}\text{C}$ . e corada com solução de Giemsa 3%, em tampão fosfato (pH= 6,8), durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas com água e secas ao ar. As fases meióticas foram observadas, fotografadas e contabilizadas.

#### 4.3.2 Detecção das Regiões de Heterocromatina Constitutiva (Banda C)

A técnica de obtenção de banda C seguiu o método de Sumner (1972), com modificação na coloração, onde foi utilizado o iodeto de propídeo, como proposto por Lui et al. (2012): as lâminas foram incubadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2M, em temperatura ambiente por 15 minutos e lavadas em água. Logo depois o material foi tratado em solução de hidróxido de bário ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) 5% durante 1 minuto à  $60^{\circ}\text{C}$  em banho maria, imediatamente lavado em HCl e água por três vezes; em seguida, as lâminas foram colocadas em solução salina de 2xSSC, durante 1 hora, à  $60^{\circ}\text{C}$ , lavadas em água destilada, secas ao ar e submetidas à coloração com iodeto de propídeo e meio de montagem (glicerol e cloreto de magnésio).

#### 4.3.3 Detecção das Regiões Ricas em Pares de Bases AT ou GC

A coloração com fluorocromos base-específicos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), que detecta regiões ricas em pares de base GC, e 4,6' -diamidino-2' -fenilindol (DAPI), que evidencia regiões ricas em pares de base AT foi feito segundo Schweizer (1980): sobre a lâmina foram adicionados 25µL de CMA<sub>3</sub> e cobertas por lamínula por 90 minutos; em seguida foram lavadas em água, secas ao ar, e adicionado 30µL de DAPI e meio de montagem (glicerol e cloreto de magnésio).

#### 4.3.4 Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH)

A técnica de FISH foi realizada de acordo com a metodologia de Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000), e as sondas de DNAr18S e Histona H3 foram isoladas de *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877), obtidos por Rincão et al. (2017).

Inicialmente, foi realizada uma desidratação das lâminas previamente preparadas, em uma série de etanol e, logo após, o tratamento com 100µL de solução RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 1 hora e depois as lâminas foram lavadas em 2xSSC. Em seguida, foram incubadas por 15 minutos, em solução de pepsina 0,005% em 10mM de HCl, em temperatura ambiente e novamente lavadas no 2xSSC.

As lâminas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% à temperatura ambiente, por 10 minutos, lavadas em 2xSSC e desidratadas em série de etanol. O “mix de hibridização” (20µL formamida 100%/ 4µL 20xSSC/ 8µL sulfato dextrano 50%/ 2µL de sonda marcada/ 0,5µL EDTA 10mM 0,5µL SDS 10%) foi colocado em banho maria à 80°C, por 10 minutos, depois imerso em gelo por 10 minutos. Foram utilizados 40µL do “mix de hibridização” para cada lâmina, sendo levadas ao termociclador para desnaturação dos cromossomos e depois incubada em câmara úmida à 37° C *overnight*.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em 2xSSC à 42° C e em formamida 20%, novamente lavadas com 2xSSC e depois em 4xSSC/Tween. A detecção do sinal foi realizada utilizando 100µL de BSA e 5µL de FITC, em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Depois foram feitas lavagens com 4xSSC/Tween por 3 vezes, durante 8 minutos cada, em temperatura ambiente no agitador, em jarro escuro e desidratação em série de etanol. As lâminas foram secas e foi feita a montagem com 30µL de meio de montagem (glicerol e cloreto de magnésio) e DAPI (2µg/mL) por lâmina. A sonda de DNAr 18S foi marcada com BioNick Labeling System (Invitrogen) e detectada com

Avidina-FITC e a sonda de Histona H3 com Cy3<sup>TM</sup> dUTP Amersham Biosciences (Thermo Fisher).

#### 4.3.5 Observação das Lâminas

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico onde foram feitas as contagens cromossômicas de 30 células meióticas e mitóticas, as observações mais detalhadas foram feitas com o auxílio da lente objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As lâminas também passaram por observação em microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens foram capturadas usando o programa Motic Images Advanced, versão 3.2. Os cromossomos foram medidos para montagem dos cariótipos usando o programa Image J (RASBAND, 1997-2018) com o uso do plugin LEVAN (SAKAMOTO; ZACARO, 2009) da metodologia de Levan, Fredga e Sandberg (1964).

## REFERÊNCIAS

- AKAN, Z.; VAROL, I.; ÖZASLAN, M. A Cytotaxonomical investigation on spiders (Arachnida: Araneae). **Environmental Biotechnology**, v. 19, p. 101-104, 2005.
- ARAUJO, D.; RHEIMS, C.A.; BRESOVIT, A.D.; CELLA, D.M. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.46, n.2, p.89-95, 2008.
- ARAUJO, D.; SCHNEIDER, M.C.; PAULA-NETO, E.; CELLA, D.M. Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. In **Meiosis-Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity**. InTech. 2012.
- ARAUJO, D.; OLIVEIRA, E.G.; GIROTI, A.M.; MATTOS, V.F.; PAULA-NETO, E.; BRESOVIT, A.D.; SCHNEIDER, M.C.; CELLA, D.M. Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. **The Journal of Arachnology**, v. 43, p. 174-181, 2015.
- ARAUJO, D.; SANCHES, M.B.; DA SILVA, J.; LIMA, G.S.; NASCIMENTO, E.V.J.; GIROTI, A.M.; BRESOVIT, A.D.; CELLA, D.M.; SCHNEIDER, M.C. Chromosomal analyses of Salticinae and Lyssomaninae reveal a broad occurrence of the  $2n_{\text{♂}} = 28, X1X20$  karyotype within Salticidae. **Journal of Arachnology**, v.44, n.2, p.148-152, 2016.
- ARAUJO, D.; SCHNEIDER, M.C.; PAULA-NETO, E.; CELLA, D.M. **The spider cytogenetic database**. 2020. Disponível em: [www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase)
- BENAVENTE, R.; WETTSTEIN, R. An ultrastructural cytogenetic study on the evolution of sex chromosomes during the spermatogenesis of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). **Chromosoma**, v. 64, p. 255-277, 1977.
- BOLE-GOWDA, B.N. A study of the chromosomes during meiosis in twenty-two species of Indian spiders. **Proceedings of the Zoological Society of Bengal**, v. 11, n. 2, p. 69-108, 1958.
- BRAZIL, T.K. **Araneae**. Disponível em: Museu de Zoologia Virtual, Universidade Federal da Bahia, 2009. (<http://www.mzufba.ufba.br/aranhas.html>).
- BRESOVIT, A.D. **Araneae**. In: Brandão CRF, Vasconcelos EM (org.) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX. Fapesp, São Paulo, p. 45-60, 1999.

BRESCOVIT, A. D.; DE OLIVEIRA, U.; DOS SANTOS, A. J. Aranhas (Araneae, Arachnida) do Estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1a, p. 1-31, 2011.

BRUM-ZORRILLA, N.; CAZENAVE, A.M. Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). **Experientia**, v.30, n.1, p.94-95, 1974.

BRUM-ZORRILLA, N.; POSTIGLIONI, A. Karyological studies on Uruguayan spiders I. Banding pattern in chromosomes of *Lycosa* species (Araneae-Lycosidae). **Genetica**, v. 54, p. 149-153, 1980.

BUGAYONG, M.J.G.; BARRION, A.A.; PAPAG, R.B. Karyotype of the egg chromosomes of the wolf spider *Hippasa holmerae* Thorell (Araneae: Lycosidae). **Philippine Agricultural Scientist**, v. 82, n. 3, p. 296-299, 1999.

CARNOY, J.B. La cytodierèse chez les arthropodes. **La Cellule**, v.1, p.191-440, 1885. ISSN 0008-8757

CHEMISQUY, M.A.; GIL, S.G.R.; SCIOSCIA, C.L.; MOLA, L.M. Cytogenetic studies of three Lycosidae species from Argentina (Arachnida, Araneae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.857-867, 2008.

CHICKERING, A.M.; HARD, W. Notes on the spermatogenesis of spiders. **Papers of the Michigan Academy Science**, v. 20, p. 589-595, 1935.

CODDINGTON, J.A.; LEVI, H.W. Systematics and evolution of spiders (Araneae). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.22, p.565-592, nov.1991. ISSN 0066-4162

CONSERVANCY, T. N. Evaluación ecoregional del Gran Chaco Americano. **Wildlife Conservation Society Bolivia**, Buenos Aires. 24p, 2005.

DATTA, S.N.; CHATTERJEE, K. Chromosome number and sex-determining system in fifty-two species of spiders from North-East India. **Chromosome Information Service**, n. 35, p. 6-8, 1983.

DATTA, S.N.; CHATTERJEE, K. Study of meiotic chromosomes of four hunting spiders of north eastern India. **Perspectives in Cytology and Genetics**, v. 6, p. 414-424, 1989.

DE ALMEIDA, S.; MESSAS, Y.; CICCHI, P. Predation on newly metamorphosed toad *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) by the spider, *Lycosa erythrognatha* (Araneae: Lycosidae). **Herpetology Notes**, v.3, p.173–174, 2010.

DIAZ, M.O.; SAEZ, F.A. Karyotypes of South American Araneidae. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 1, p. 153-154, 1966.

DOLEJŠ, P.; KOŘÍNKOVÁ, T.; MUSILOVÁ, J.; OPATOVÁ, V.; KUBCOVÁ, L.; BUCHAR, J. and KRÁL, J. Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca* and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). **European Journal of Entomology**, v.108, p.1-16, 2011.

EDWARDS, J. S.; THORNTON, W. B. Colonization of an island volcano, Long Island, Papua New Guinea, and an emergent island, Motmot, in its caldera lake. VI. The pioneer arthropod community of Motmot. **Journal Biogeography**, v.28, p.1379–1388, 2001.

FOELIX, R.F. '**Biology of Spiders.**' 3rd ed. Oxford University Press: New York, 2011.

FORMAN, M.; NGUYEN, P.; HULA, V.; KRÁL, J. Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). **Cytogenetic and genome research**, v.141, n.1, p.43-49, 2013.

GORLOV, I.P.; GORLOVA, O.YU; LOGUNOV, D.V. Cytogenetic studies on Siberian spiders. **Hereditas**, v. 122, p. 211-220, 1995.

GORLOVA, O.YU; GORLOV, I.P.; NEVO, E.; LOGUNOV, D.V. Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. **Bulletin of the British Arachnological Society**, v. 10, n. 7, p. 249-252, 1997.

HACKMAN, W. Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer berücksichtigung der geschlechtschromosomen. **Acta Zoologica Fennica**, v. 54, p. 1-101, 1948.

HARD, W.L. The spermatogenesis of the lycosid spider *Schizocosa crassipes* (Walckenaer). **Journal of Morphology**, v. 65, n. 1, p. 121-153, 1939.

HOEFLER, C. D., PERSONS, M. H., RYPSTRA, A. L. Evolutionarily costly courtship displays in a wolf spider: a test of viability indicator theory. **Behavioral Ecology**, v.19, p.974–979, 2008.

INBIOVERITAS (S. Scharf.). **Sistemática e Evolução**. Ludger Scheuermann; Hubert Höfer; Florian Raub. 2012. Disponível em: [http://www.inbioveritas.net/en/spiders/team\\_engl](http://www.inbioveritas.net/en/spiders/team_engl)

KAGEYAMA, A.; SETO, T.; INOUE, H. Chromosomes of Japanese lycosid spiders. **Chromosome Information Service**, n. 25, p. 26-27, 1978.

KOŘÍNKOVÁ, T.; KRÁL, J. **Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders**. In: Spider Ecophysiology, W. Netwig (Ed.), Springer-Verlag Berlin, p. 159-171, 2013.

KRÁL, J. Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. **Chromosome Research**, v.15, p.863–879, 2007.

KRÁL, J.; KOŘÍNKOVÁ, T.; FORMAN, M.; KRKAVCOVÁ, L. Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. **Cytogenetic and Genome Research**, v.133, p.43-66, 2011.

KRÁL, J.; KOŘÍNKOVÁ, T.; KRKAVCOVÁ, L.; MUSILOVÁ, J.; FORMAN, M.; HERRERA, I.M.Á.; HADDAD, C.R.; VÍTKOVÁ, M.; HENRIQUES, S.; VARGAS, J.G.P.; HEDIN, M. Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.109, n.2, p.377-408, 2013.

KRÁL, J.; FORMAN, M.; KOŘÍNKOVÁ, T.; LERMA, A.C.R.; HADDAD, C.R.; MUSILOVÁ, J.; ŘEZÁČ, M.; HERRERA, I.M.A.; THAKUR, S.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A.S.; MAREC, F.; HOROVÁ, L.; BUREŠ, P. Insights into the karyotype and genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. **Scientific Reports**, v. 9: 3001, 2019.

KUMBIÇAK, Z.; ERGENE, S. and SAYGIDEĞER, S. Chromosomal data on six araneomorph spiders belonging to the families Lycosidae and Gnaphosidae (Araneae: Araneomorphae). **Zoology in the Middle East**, v. 48, p. 89-96, 2009.

KUMBIÇAK, Z.; ERGENE, S.; KARATAŞ, A. and KUMBIÇAK, Ü. Cytogenetic studies on five species of spiders from Turkey (Araneae: Gnaphosidae, Lycosidae). **Journal of Arachnology**, v. 39, p. 490-494, 2011.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, p.433-438, 2012.

MATSUMOTO, S. An observation of somatic chromosomes from spider embryonic cells. **Acta Arachnologica**, v. 27, special number, p. 167-172, 1977.

MITTAL, O.P. Chromosome number and sex mechanism in twenty species of the Indian spiders. **Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University**, v. 11, n. 3-4, p. 245-247, 1960.

MITTAL, O.P. Chromosome number and sex mechanism in twenty-one species of the Indian spiders. **Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University**, v. 12, n. 3-4, p. 271-273, 1961.

MITTAL, O.P. Karyological studies on the Indian Spiders I. A comparative study of the chromosomes and sex-determining mechanism in the family Lycosidae. **Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University**, v. 14, n. 1-2, p. 59-86, 1963.

MONTGOMERY, T.H. The spermatogenesis of *Syrbula* and *Lycosa*, with general considerations upon chromosome reduction and the heterochromosomes. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 57, p. 162-205, 1905.

MUNGUÍA, W.P. **Phylogenetic relationships of the wolf spider genus *Orinocosa* Chamberlin, 1916:(Araneae, Lycosidae)** Master's thesis, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

MURPHY, N.P.; FRAMENAU, V.W.; DONNELLAN, S.C.; HARVEY, M.S.; PARK, Y.C.; AUSTIN, A.D. Phylogenetic reconstruction of the wolf spiders (Araneae: Lycosidae) using sequences from the 12S rRNA, 28S rRNA, and NADH1 genes: implications for classification, biogeography, and the evolution of web building behavior. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.38, n.3, p.583-602, 2006.

NAVIA, J.F.F.; VIZZARETA, R.O.; YUNQUE, E.L. Observaciones Cromosómicas en la Araña *Lycosa* sp. (Arachnida). **El Antoniano**, n.111, p.91-92, 2006.

PAINTER, T.S. Spermatogenesis in spiders. **Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Anatomie und Ontogenie der Tiere**. v.38, p.509-576, 1914.

PARIDA, B.B.; MOHANTY, P.K.; SAHOO, P.; MOHAPATRA, A. Studies on spermatocytic chromosomes of an aquatic wolf spider, *Hippasa madhuae* Tikader and Malhotra (Lycosidae: Araneae). **Current Science**, v. 55, n. 19, p. 997-998, 1986.

PARIDA, B.B.; SHARMA, N.N. Chromosome number, sex mechanism and genome size in 27 species of Indian spiders. **Chromosome Information Service**, n. 43, p. 11-13, 1987a.

PARIDA, B.B.; SHARMA, N.N. Cytological studies on Indian Spiders I. Meiosis in three species of wolf spiders (Lycosidae: Arachnida). **Caryologia**, v. 40, n. 1-2, p. 89-97, 1987b.

PENG Y., HU C., ZHAO J.; CHEN J. Karyotype analysis of *Pirata piraticus* (Araneae: Lycosidae). **Acta Arachnologica Sinica**, v.7, p.142-145 [in Chinese, English abstr.], 1998.

POLOTOW, D.; CARMICHAEL, A.; GRISWOLD, C.E. Total evidence analysis of the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae). **Invertebrate Systematics**, v.29, n.2, p.124-163, 2015.

POSTIGLIONI, A.; BRUM-ZORRILLA N. Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae). **Genetica**, v. 56, p. 47-53, 1981.

RASBAND, W.S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

REZÁČ, M.; KRÁL, J.; MUSILOVÁ, J.; PEKÁR, S. Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). **Hereditas**, v.143, p.123-129, dec. 2006. ISSN 0018-0661

RINCÃO, M.P.; CHAVARI, J.L.; BRESCOVIT, A.D. and DIAS, A.L. Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. **Comparative Cytogenetics**, v. 11, n. 4, p. 627-639, 2017.

RODRÍGUEZ-GIL, S.G.; MERANI, M.S.; SCIOSCIA, C.L.; MOLA, L.M. Cytogenetics in three species of *Polybetes* Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. **Journal Arachnology**, v.35, p.227–237, 2007.

SAKAMOTO, Y.; ZACARO, A. A. **LEVAN**, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, 2009.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.27, p.190-193, 1980.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. **Practical in situ hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltda, Oxford, 199p, 2000.

SHARMA, G.P.; JANDE, S.S.; GREWAL, M.S.; CHOPRA, R.N. Cytological studies on the Indian spiders II. Chromosome complement and meiosis in seven species of the family Lycosidae. **Research Bulletin of Panjab University**, v. 156, p. 255-269, 1958.

SHARMA, G.P.; GUPTA, B.L. Cytological studies on the male germ cells of the spider, *Pardosa* sp., with observations under the phase contrast microscope. **Research Bulletin of Panjab University**, v. 84, p. 5-19, 1956.

SHARMA, N.; PARIDA, B.B. Study of chromosomes in spiders from Orissa. **Pranikee**, v. 8, p. 71-76, 1987.

SHARMA, T. A study on the chromosomes of two lycosid spiders. **Proceedings of the Zoological Society, Calcutta**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1961.

SOKOLOV, I.I. Studies on nuclear structures in spiders (Araneina). I. Karyological peculiarities in spermatogenesis. **Voprosy tsitologii i protistologii**, p. 160-186, 1960.

SRIVASTAVA, M.D.L.; SHUKLA, S. Chromosome number and sex-determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. **Chromosome Information Service**, n. 41, p. 23-26, 1986.

STRATTON, G. E. Investigation of species divergence and reproductive isolation of *Schizocosa stridulans* (Araneae: Lycosidae) from Illinois. **Bulletin of the British Arachnological Society**, v. 10, n. 9, p. 313-321, 1997.

STRATTON, G. E.; UETZ, G. W. Communication via substratum-coupled stridulation and reproductive isolation in wolf spiders (Araneae: Lycosidae). **Animal Behaviour** v.31, p.164–172, 1983.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-6, 1972.

SUZUKI, S. Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fiftyseven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. **Journal of Science of the Hiroshima University**, Series B, Division 1, v.15, p.23-136, 1954. ISSN 0368-4113

TAŞDEMİR, B.; VAROL, I. and AKPINAR, A. Cytotaxonomical studies on six species of spiders (Arachnida: Araneae) from Turkey. **Türkiye entomoloji bülteni**, v. 2, n. 2, p. 55-59, 2012.

TUGMON, C.R.; BROWN, J.D.; HORNER, N.V. Karyotypes of seventeen USA spider's species (Araneae, Araneidae, Gnaphosidae, Loxoscelidae, Lycosidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae and Theridiidae). **The Journal of Arachnology**, v. 18, p. 41-48, 1990.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.913-915, 2008.

WHEELER, W. C.; CODDINGTON, J. A.; CROWLEY, L. M.; DIMITROV, D.; GOLOBOFF, P. A.; GRISWOLD, C. E.; HORMIGA, G.; PRENDINI, L.; RAMÍREZ, M.J.; SIERWALD, P.; ALMEIDA-SILVA, L.; ARNEDO, M.A.; SILVA, L.R.B.; BENJAMIN, S.P.; BOND, J.E.; GRISMADO, C.J.; HASAN, E.; HEDIN, M.; IZQUIERDO, M.A.; LABARQUE, F.M.; LEDFORD, J.; LOPARDO, L.; MADDISON, W.P.; MILLER, J.A.; PIACENTINI, L.N.; PLATNICK, N.I.; POLOTOW, D.; SILVA-DÁVILA, D.; SCHARFF, N.; SZUTS, T.; UBICK, D.; VINK, C.J.; WOOD, H.M.; ZHANG, J. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. **Cladistics**, v.33, n.6, p.574-616, 2016.

WILDER, S. M.; RYPSTRA, A.L. Males make poor meals: a comparison of nutrient extraction during sexual cannibalism and predation. **Oecologia**, v.162, p.617–625, 2010.

WILLIAMS, K.; FORD, A.; ROSAUER, D.; SILVA, N.; MITTERMEIER, R.; BRUCE, C.; LARSEN, F. W.; MARGULES, C. **Forests of East Australia**: The 35th Biodiversity Hotspot. In: Zachos FE & Habel JC (eds.) Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Springer, New York. p. 295-310, 2011.

WISE, D. An electron microscope study of the karyotypes of two wolf spiders. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 25, p. 161-168, 1983.

WISE, D.A.; TAYLOR, J.L. On the mechanism of homologous synapsis in lycosis spiders. **Genome**, v. 38, p. 443-449, 1995.

WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog. Version 19.5**. Natural History Museum Bern, 2020. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2

YANG Z., WANG X., WANG Y., CUI S.; HU H. On karyotype analysis of the *Pardosa astrigera* (Araneida: Lycosidae). **Acta Arachnologia Sinica**, v.5, p.145–148 [in Chinese, English abstr.], 1996.

YANG Z., WANG X., WANG Y.; CUI S. On the karyotype of *Pirata piratoides* (Araneae: Lycosidae). **Acta Arachnologia Sinica** v.6, p.23–25 [in Chinese, English abstr.], 1997.

YU, P.; CUI, H.; JINGZHAO, Z.; JIAN, C. Karayotype analysis of *Pirata piraticus* (Araneae: Lycosidae). **Acta Arachnologia Sinica**, v. 7, n. 2, p. 142-145, 1998a.

YU, P.; CUI, H.; JINGZHAO, Z. Preliminary studies on the chromosome of *Pirata subpiraticus* Bosenberg et Strand (Araneida: Lycosidae). **Journal of Zheijiang Agricultural University**, v. 24, n. 3, p. 291-294, 1998b.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; TANG, X.; WANG, F.; JIANG, L.; XIONG, X.; WANG, M.; RONG, M.; LIU, Z.; LIANG, S. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Zoology**, v.113, p.10–18, 2010.

ZHENLING, Y.; XIUZHEN, W.; YOUJU, W.; SUJUAN, C. and HAIYIN, H. On karyotype analysis of the *Pardosa astrigera* (Araneida: Lycosidae). **Acta Arachnologia Sinica**, v. 5, n. 2, p. 145-148, 1996.

ZHENLING, Y.; XIUZHEN, W.; YOUJU, W. and SUJUAN, C. On the karyotype of *Pirata piratoides* (Araneae: Lycosidae). **Acta Arachnologia Sinica**, v. 6, n. 1, p. 23-25, 1997.

## Capítulo 1

# DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA EM TRÊS ESPÉCIES DE *Lycosa* Latreille, 1804 (ARANEAE, LYCOSIDAE): *INSIGHTS* SOBRE EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA NO GÊNERO

Este artigo será submetido a revista  
**Genetics and Molecular Biology**

Diversidade cromossômica em três espécies de *Lycosa* Latreille, 1804 (Araneae, Lycosidae): *Insights* sobre evolução cariotípica no gênero

Analiza Fernanda Cavenagh<sup>1</sup>, Matheus Pires Rincão<sup>1</sup>, Antonio Domingos Brescovit<sup>2</sup>, Ana Lúcia Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Animal (LACA) Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná – Brasil

<sup>2</sup>Laboratório Especial de Coleções Zoológicas – Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP - Brasil

## Resumo

Lycosidae é uma família de aranhas que possui uma alta variação de números diploides, sendo *Lycosa* um dos gêneros mais numerosos no grupo e com espécies portadoras de sistemas cromossômicos sexuais raros. Apesar de ser uma das famílias mais estudadas citogeneticamente, somente 5% do seu total de espécies possui dados citogenéticos. Diante disto, o presente estudo realizou análises citogenéticas em três espécies de *Lycosa* visando contribuir para um melhor entendimento da estrutura e evolução cromossômica neste grupo. Foi observado em *L. erythrognatha* e *L. sericovittata*  $2n_{\text{♂}}=22$  e um Sistema Cromossômico Sexual (SCS)  $X_1X_20$  e em *L. nordenskjoldi*  $2n_{\text{♂}}=19$  com SCS  $X0$  e morfologia exclusiva acrocêntrica. A heterocromatina foi observada na região pericentromérica em todo o conjunto cromossômico das três espécies, entretanto, um indivíduo de *L. sericovittata* apresentou dois cromossomos com marcação terminal e o grupo *L. nordenskjoldi* quatro cromossomos com marcações intersticiais e um terminal. Toda heterocromatina pericentromérica foi  $CMA_3^+$ , assim como a marcação terminal em *L. sericovittata*. Os sítios de DNAr 18S mostraram diferenças entre e dentro das espécies, relacionadas ao número e tipo de cromossomos portadores. *L. nordenskjoldi* foi a espécie que apresentou maior variação tanto intra quanto interpopulacional. Essas alterações podem estar relacionadas a uma dispersão do gene através de elementos de transposição e eventos de translocação. Apesar disso, as três espécies apresentaram um dos sítios de DNAr 18S no par 5, evidenciando um provável caráter conservado. A histona H3 foi visualizada somente em *L. erythrognatha* na região pericentromérica do par 3. Diante dos dados de  $2n$  e SCS existentes em *Lycosa*, até o momento, foi proposto um esquema evolutivo para o gênero sugerindo uma relação complexa entre os cariótipos.

**Palavras – chave:** Aranhas, DNAr, FISH, Heterocromatina, Histona H3.

## Introdução

As aranhas são animais predadores, alimentando-se sobretudo de insetos e outros invertebrados, incluindo outras aranhas, o que as tornam responsáveis por um grande papel no equilíbrio biológico (Gonzaga *et al.*, 2007). Entretanto, esses organismos raramente são preservados, devido ao fato de não serem muito apreciados pela maior parte das pessoas, em decorrência da grande falta de conhecimento que a população, em geral, tem sobre eles (Foelix, 2011). Hofer e Brescovit (1997) sugeriram que as aranhas seriam ótimas bioindicadores para

diagnósticos da fragilidade de áreas alteradas, pois a araneofauna é muito influenciada pela mudança dos habitats (Uetz, 1991), o que pode gerar variações dentro dos grupos, devido à necessidade de adaptações recorrentes.

As aranhas da superfamília Lycosoidea, pertencentes ao clado Entelegynae em Araneomorphae, são um grupo altamente diversificado, com mais de 6.000 espécies e 422 gêneros (World Spider Catalog, 2020), distribuídos em sete famílias: Ctenidae, Lycosidae, Oxyopidae, Pisauridae, Psecridae, Thomisidae e Trechaleidae (Wheeler *et al.*, 2016). Lycosidae, representada por 2400 espécies e 125 gêneros, compreende quase 50% do número de espécies descritas em Lycosoidea (World Spider Catalog, 2020), e tem sido foco de estudos como organismos modelo em relações ecológicas e de comportamento (Stratton e Uetz, 1983; Hoefler *et al.*, 2008; Wilder e Rypstra, 2010). As aranhas desta família são conhecidas popularmente como aranhas lobo, que são muito ágeis, de hábitos noturnos (Foelix, 2011) e não são consideradas venenosas, entretanto, são importantes agentes de controle biológico.

Apesar da sua grande importância ecológica, os estudos citogenéticos em aranhas ainda são escassos, em comparação com o número de espécies descritas na ordem Araneae. Porém, já se pode evidenciar uma alta variabilidade cariotípica (Araujo *et al.*, 2020). Dentro da superfamília Lycosoidea o número diploide mais observado é  $2n♂=28$ , exceto em Oxyopidae ( $2n♂=21$ ) e em Thomisidae ( $2n♂=23$ ). Além disso, os cromossomos possuem morfologia quase exclusivamente acrocêntrica em todas as famílias do clado (Araujo *et al.*, 2020).

Lycosidae é uma das famílias mais bem estudadas do ponto de vista citogenético, entretanto, apenas cerca de 5%, do seu total de espécies descritas, apresentam dados cromossômicos, indicando uma grande lacuna no conhecimento deste grupo de aranhas tão numeroso e disperso. Até o momento, se pode observar na família um número diploide oscilando entre 18 e 30 cromossomos, em sua maioria acro/telocêntricos, com predominância de  $2n♂=28$ , relatado em 62 das 120 espécies analisadas citogeneticamente. O sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo  $X_1X_2O/X_1X_1X_2X_2$  em Lycosidae, está presente em 94% dos cariótipos descritos (Araujo *et al.*, 2020) e as variações estão restritas à ocorrência de sistemas  $XO$  a exemplo do observado em *Lycosa nordenskjoldi* Tullgren, 1905 (Araujo *et al.*, 2015),  $X_1X_2X_3O$  em *Lycosa* sp. (grupo *thorelli*) (Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1981) e  $X_1X_2Y$  em *Lycosa* sp. (Navia *et al.*, 2006).

Os estudos de bandeamento cromossômico ainda são pouco encontrados dentro da família. Os primeiros dados com a técnica de bandeamento C foram publicados em 1974, por Brum-Zorrilla e Cazenave, que observaram uma distribuição da heterocromatina nas regiões pericentroméricas em *Schizocosa malitiosa* (Tullgren, 1905) (citada como *Lycosa malitiosa*). Mais tarde, Brum-Zorrilla e Postiglioni (1980), sugeriram que a baixa concentração de heterocromatina nesta espécie estivesse relacionada com um tipo de proteção contra possíveis recombinações, se preservando assim ao longo da evolução.

Chemisquy *et al.* (2008) e Dolejš *et al.* (2011), analisando outras espécies de Lycosidae, também observaram o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina. O gênero *Lycosa*, objeto deste estudo, possui 15 espécies analisadas com dados citogenéticos, além de 19 sem espécie definida (*Lycosa* sp.) (**Tabela 1**) e, dentre todas essas, apenas duas, *L. erythrognatha* Lucas, 1836 e *L. thorelli* (Keyserling, 1877), mostram dados de bandeamento C, com blocos heterocromáticos na região pericentromérica de todo o conjunto cromossômico (Brum-Zorrilla e Postiglioni, 1980; Chemisquy *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2015).

Chemisquy *et al.* (2008) utilizaram, além do bandeamento C, fluorocromos base específicos como a cromomicina A<sub>3</sub>, mostrando que as regiões heterocromáticas em *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836 eram ricas em pares de base GC, sendo esta a única espécie na família com dados de fluorocromos.

Uma outra técnica de bandeamento cromossômico é a impregnação por nitrato de prata para observação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), utilizada por Wise (1983) em *Tigrosa georgicola* (Walckenaer, 1837), citada como *Lycosa georgicola* e por Dolejš *et al.* (2011) em *Arctosa cinerea* (Fabricius, 1777), *Arctosa lutetiana* (Simon, 1876), *Xerolycola miniata* (C.L. Koch, 1834) e *Xerolycosa nemoralis* (Westring, 1861), mostrando em todas essas espécies dois pares cromossômicos carregando as RONs.

Posteriormente, Forman *et al.* (2013) utilizaram, além da impregnação por nitrato de prata, a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, para observar as RONs em *Wadicosa fidelis* (O. Pickard-Cambridge, 1872), sendo este o único trabalho com FISH em Lycosidae, até o momento. As análises de Forman *et al.* (2013) trouxeram novas observações relacionadas às RONs neste grupo, sendo observados três bivalentes com a impregnação pelo nitrato de prata e de sete a dez com o uso da técnica de FISH.

Diante estas informações, o objetivo do presente estudo foi estender as análises citogenéticas além de uma análise convencional neste grupo de aranhas. Para isso, foram utilizadas diferentes técnicas de bandeamento cromossômico em três espécies de *Lycosa*, de diferentes localidades, com o intuito de analisar a variabilidade cariotípica, o SCS, a distribuição da heterocromatina e o comportamento de uma sequência de DNA repetitivo, o DNAr 18S, e de uma sequência de Histona H3. As informações obtidas forneceram contribuições significativas sobre a ocorrência de possíveis eventos evolutivos nos cariótipos das espécies de *Lycosa*.

## Material e Métodos

Foram realizadas análises citogenéticas de três espécies de *Lycosa*, coletadas em cinco localidades do estado do Paraná (**Tabela 2**). Os espécimes foram depositados na coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas no Instituto Butantan (IBSP, curador A.D. Brescovit) em São Paulo/SP, Brasil. As preparações cromossômicas foram feitas de acordo com o proposto por Araujo *et al.* (2008), com a utilização de testículos de aranhas jovens e adultas. As lâminas foram coradas com Giemsa 3%, sendo analisadas 30 células mitóticas e meióticas para determinação do número diploide. Os cromossomos tiveram sua morfologia classificada com auxílio do programa Image J (Rasband, 1997-2018) com o uso do plugin LEVAN (Sakamoto e Zacaro, 2009), de acordo com a metodologia descrita por Levan *et al.* (1964). As lâminas foram submetidas à técnica de bandamento C, segundo Sumner (1972), com modificação na coloração, onde foi utilizado o iodeto de propídeo, como proposto por Lui *et al.* (2012). Foram utilizados fluorocromos base-específicos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4,6'-diamidino-2'fenilindol (DAPI), segundo o protocolo de Schweizer (1980).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com o protocolo de Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). As sondas de DNAr 18S e Histona H3 foram obtidas de *Ctenus ornatus* por Rincão *et al.* (2017). A sonda de DNAr 18S foi marcada com BioNick Labeling System (Invitrogen) e detectada com Avidina-FITC) e Histona H3 marcada com Cy3<sup>TM</sup> dUTP Amersham Biosciences (Thermo Fisher) e contra coradas com DAPI. Por fim, as lâminas de FISH foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens foram capturadas usando o programa Motic Images Advanced, versão 3.2.

## Resultados

*Lycosa erythrognatha* e *L. sericovittata* apresentaram  $2n_{\text{♂}} = 22$  e SCS  $X_1X_20$  (**Figura 1a, b**, respectivamente), enquanto *L. nordenskjoldi* apresentou  $2n_{\text{♂}} = 19$  e SCS  $X0$  (**Figura 1c**), as três espécies mostraram todos cromossomos com morfologia acrocêntrica. Cada espécie mostrou um padrão diferente de tamanho dos cromossomos sexuais: em *L. erythrognatha* são os dois maiores do complemento, em *L. sericovittata* um cromossomo de tamanho mediano e um dos menores e *L. nordenskjoldi* apresentou o cromossomo X como o menor de todo conjunto (**Figura 1**).

Nas células meióticas de machos pode-se observar nos paquítenos das três espécies os cromossomos sexuais bem visíveis devido sua alta condensação, apresentando uma heteropicnose positiva (**Figura 2a, e, i**). As células em diplóteno de *L. erythrognatha* e *L. sericovittata* (**Fig. 2b, f**, respectivamente) mostraram 10 bivalentes autossômicos e dois univalentes sexuais ( $10II+X_1X_2$ ), já *L. nordenskjoldi* (**Figura 2j**) apresentou 9 bivalentes autossômicos e um univalente sexual ( $9II+X$ ), com maior ocorrência de quiasmas terminais nas três espécies. Em diacinese pode ser bem observado os univalentes sexuais dispostos lado a lado ou muito próximos, em todas as espécies (**Figura 2 c, g, k**).

As células em metáfases II mostraram 10 e 12 cromossomos em *L. erythrognatha* (**Figura 2d**) e *L. sericovittata* (**Figura 2h**), com os univalentes sexuais migrando para o mesmo polo, confirmando o SCS  $X_1X_20$ . Em *L. nordenskjoldi* (**Figura 2i**) pode ser observado células em metáfases II com 10 e 9 cromossomos, confirmando o SCS  $X0$ .

As células testiculares submetidas ao bandamento C nas três espécies (**Figura 3 a, b, c**), mostraram marcações heterocromáticas pericentroméricas em todos os cromossomos; além disso, *L. sericovittata* também mostrou um par cromossômico com marcação terminal (**Figura 3b**) e *Lycosa nordenskjoldi* apresentou algumas marcações intersticiais (**Figura 3c**).

A coloração com fluorocromos  $CMA_3$  evidenciou algumas diferenças entre as espécies: *Lycosa erythrognatha* (**Figura 3d**) apresentou marcações pericentroméricas  $CMA_3^+$  em todos os cromossomos coincidindo com as regiões heterocromáticas; *L. sericovittata* também apresentou marcações pericentroméricas  $CMA_3^+$  em todos os cromossomos e dois cromossomos com marcação terminal  $CMA_3^+$  (**Figura 3e**),

observado somente em um espécime e *L. nordenskjoldi* mostrou marcações pericentroméricas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (**Figura 3f**).

A coloração com fluorocromo DAPI não evidenciou marcações nas três espécies (dados não mostrados).

A FISH com sonda de DNAr 18S mostrou marcações em dois pares cromossômicos em *L. erythrognatha*, com variação interpopulacional em relação aos pares portadores: no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e Universidade Estadual de Londrina (UEL) os sítios de DNAr 18S foram localizados nos pares 5 e 9 (**Figura 4a**), e no Parque Nacional do Superagui (PNS) e Parque Nacional do Iguaçu (PNI) nos pares 2 e 5 (**Figura 4b**). Nesta mesma espécie também foram localizados sítios de histona H3 no terceiro par autossômico.

Em *L. sericovittata* a FISH também identificou quatro marcações para DNAr 18S, nos pares 5 e 9 (**Figura 4c**).

Em *L. nordenskjoldi* foi identificada uma variação de quatro, seis e sete sítios de DNAr 18S entre e dentro das populações e com variação também nos pares cromossômicos: no Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) observaram-se espécimes portadores de quatro sítios nos pares 5 e 9 (**Figura 5a**) e indivíduos com seis sítios nos pares 2, 3 e 5; porém, nem todos os pares possuíam os sítios visíveis nos cromossomos (**Figura 5b**); na população do PNS os sítios estavam presentes nos pares 1, 3, 5 e 8 (**Figura 5c**), e em apenas um dos homólogos do par 3.

## Discussão

### Análise cariotípica

O número diploide, SCS e morfologia cromossômica, exclusivamente acrocêntrica, encontrados em *Lycosa erythrognatha*, *L. sericovittata* e *L. nordenskjoldi* condizem com os trabalhos existentes para as três espécies (Diaz e Saez, 1966; Chemisquy *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2015) entretanto, apenas *Lycosa nordenskjoldi* foi analisada anteriormente em uma outra população do estado do Paraná (Araujo *et al.*, 2015). Além disso, essa morfologia cromossômica acro/telocêntrica é “típica” de Entelegynae (Dolejš *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2015) e considerada como derivada (Král *et al.*, 2013).

Outras quatro espécies do mesmo gênero também apresentaram o padrão observado em *L. erythrognatha* e *L. sericovittata*, de  $2n_{\text{♂}} = 22$ ,  $X_1X_20$ : *L. chaperi* Simon, 1885 (Mittal, 1963), *L. thorelli* (Keyserling, 1877) (Brum-Zorrilla e Postiglioni, 1980), *L. carmichaeli* Gravely, 1924 (Srivastava e Shukla, 1986) e *L. pampeana* Holmberg, 1876 (Chemisquy *et al.*, 2008). No entanto, dentro de Lycosidae apenas *L. nordenskjoldi* e *Hogna sternalis* (Bertkau, 1880) possuem  $2n_{\text{♂}} = 19$ ,  $X0$  (Araujo *et al.*, 2020; presente estudo) o que mostra que, até o momento, este é um número diploide raro neste grupo de aranhas.

Apesar do SCS, do tipo  $X_1X_20$ , encontrado em *L. erythrognatha* e *L. sericovittata* ser muito comum em Lycosidae e estar caracterizado como uma condição considerada ancestral em aranhas (Araujo *et al.*, 2016), o número diploide equivalente a 22 cromossomos ocorre em menos de 20% das espécies já descritas dentro da família onde, das 120 espécies analisadas, 62 possuem um  $2n_{\text{♂}} = 28$  (Araujo *et al.*, 2020). Contudo, ao se analisar a ocorrência desses dois números diploides apenas em *Lycosa*, podemos observar uma frequência de, aproximadamente, 32 e 35% para  $2n_{\text{♂}} = 22$  e 28, respectivamente, com os  $2n_{\text{♂}}$  mais raros, que variam entre 18 e 27 cromossomos, apresentando entre 3 e 6% de representatividade, como mostrado na **Tabela 1**, ou seja, dentro do gênero o  $2n$  é definido, só não há uma predominância.

O baixo número de espécies analisadas no gênero associado à variação cromossômica, e o fato de *Lycosa* ser tratada como um depósito de espécies portanto, um grupo polifilético, impossibilita estimar o número diploide ancestral do gênero, bem como estabelecer as relações evolutivas entre seus cariótipos.

### **Padrão de Distribuição da Heterocromatina**

Chemisquy *et al.* (2008), ao avaliar a distribuição da heterocromatina em Lycosidae, observaram que ocorre uma heterogeneidade na sua composição em espécies da família, resumindo da seguinte forma: a) heterocromatina pericentromérica banda C positiva e rica em GC como em *L. erythrognatha* (Chemisquy *et al.*, 2008); b) heterocromatina pericentromérica banda C positiva e rica em AT como observado em *Schizocosa malitiosa*, *L. thorelli* e em *Lycosa* sp. (Brum-Zorrilla e Postiglioni, 1980) e c) heterocromatina telomérica que não detecta banda C e é rica em AT também em *Lycosa* sp., analisado no trabalho de Brum-Zorrilla e Postiglioni (1980).

Nas três espécies aqui analisadas, o primeiro padrão descrito por Chemisquy *et al.* (2008) se mostrou predominante. Contudo, um espécime de *L. sericovittata* apresentou um bivalente com região telomérica que detecta banda C e rica em GC, e além de *L. nordenskjoldi* que possui distribuição de heterocromatina pericentromérica, intersticial e terminal e, ainda assim, só detecta sequências ricas em pares de base GC na região pericentromérica. Nosso estudo então, identificou mais dois padrões: heterocromatina telomérica que detecta banda C e é rica em GC e heterocromatina intersticial banda C positiva que não detecta GC/AT.

Dolejš *et al.* (2011), Král *et al.* (2011) e Kořínková e Král (2013) também apresentaram resultados relacionados à distribuição de heterocromatina em Lycosidae, onde se pode observar uma constância de pequenos e médios blocos, localizados na região pericentromérica de todo o conjunto cariotípico nas 14 espécies analisadas, distribuídas nos gêneros: *Alopecosa* Simon, 1885; *Arctosa* C. L. Koch, 1847; *Lycosa* Latreille, 1804; *Pardosa* C. L. Koch, 1847; *Pirata* Sundevall, 1833; *Piratula* Roewer, 1960; *Schizocosa* Chamberlin, 1904; *Xerolycosa* Dahl, 1908. É interessante notar que, juntamente com os dados apresentados por Chesmisquy *et al.* (2008), esse perfil de heterocromatina, restrita às regiões pericentroméricas, havia se apresentado como único padrão dentro de Lycosidae. Nossos dados, portanto, demonstram novos padrões de distribuição de heterocromatina dentro da família, mostrando que *L. nordenskjoldi* apresenta uma heterocromatina mais dispersa do que observado até agora.

Apesar das variações encontradas, entre alguns espécimes, as populações analisadas de cada espécie não se mostraram diferentes, demonstrando que marcadores cromossômicos simples, como bandeamento C e coloração com fluorocromos, podem diferenciar espécies do mesmo gênero, como já foi observado por Oliveira *et al.* (2015). Nesse estudo, os autores usaram peixes Characiformes, onde as regiões ricas em GC eram distribuídas de forma dinâmica entre as espécies analisadas do gênero *Hoplias* Gill, 1903.

Além disso, a presença de bandas intersticiais em *L. nordenskjoldi* sugerem que rearranjos cromossômicos, como inversões paracêntricas e eventos de dispersão da heterocromatina estão intimamente relacionados com os processos de diferenciação cariotípica no grupo.

## **Análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo**

As análises das RONS em Lycosidae ainda são escassas e, até momento, apenas Forman *et al.* (2013) utilizaram a técnica de FISH para observar estas regiões, evidenciando até dez sítios de DNAr 18S em *Wadicosa fidelis*. Nos demais trabalhos com diferentes espécies de Lycosidae, foi observada a ocorrência de dois pares autossômicos portadores das RONS, pela impregnação com nitrato de prata, como em *Tigrosa georgicola* (Walckenaer, 1837) citada como *Lycosa georgicola*, analisada por Wise (1983); *Arctosa cinerea* (Fabricius, 1777), *Arctosa lutetiana* (Simon, 1876), *Xerolycosa miniata* (C.L. Koch, 1834) e *Xerolycosa nemoralis* (Westring, 1861) analisadas por Dolejš *et al.* (2011). Com base nesses dados, Dolejš *et al.* (2011) sugeriram que este perfil, composto de dois pares autossômicos portadores das RONS, poderia ser um padrão ancestral dentro de Lycosoidea.

No presente estudo pode ser observada uma variação numérica e do par cromossômico portador dos sítios de DNAr 18S entre as três espécies. *Lycosa erythrognatha*, embora tenha apresentado dois pares portadores dos sítios de DNAr, mostrou uma variação interpopulacional em relação à posição desses cromossomos no cariótipo. Além disso, também foi observado que em *L. erythrognatha* e *L. sericovittata* os sítios de DNAr 18S estavam localizados nos mesmos pares cromossômicos, nas populações do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e do Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL), localizadas no norte do estado do Paraná, composto de uma vegetação de Floresta Estacional Semidecídua de clima mais seco.

Nas populações de *L. erythrognatha* do Parque Nacional do Superagui - PNS (litoral norte) região com vegetação composta de ilhas e manguezais e clima mais tropical, assim como Parque Nacional do Iguaçu - PNI (extremo oeste) que detém uma das maiores áreas conservadas de Mata Atlântica e também de clima tropical, um perfil diferente foi encontrado, no que se refere à distribuição dos sítios de DNAr 18S em relação às duas outras populações. E, apesar da grande distância entre os dois pontos (PNS e PNI), os perfis foram iguais entre eles, levantando a questão de que uma possível pressão evolutiva que possa estar atuando, de modo diferenciado sobre as populações, relacionado a possíveis adaptações dos grupos aos habitats que se encontram.

Essa variação populacional dos pares portadores dos sítios de DNAr 18S, pode estar relacionada a uma dispersão do gene através de transposições ou translocações, como sugerida por Cabral de Melo *et al.* (2011) em seu estudo com

coleópteros (Scarabaeinae). Esses autores colocam que, quando não ocorrem alterações significativas no cariótipo (aumento ou diminuição do  $2n$ , por exemplo), essas mudanças nos sítios ribossômicos podem estar acontecendo por uma própria “multiplicação” dos sítios e sua localização na região distal, que é uma região cromossômica considerada mais dinâmica, facilita a dispersão desses segmentos por todo o genoma. No presente estudo, eventos de amplificação e dispersão poderiam ser auxiliados, principalmente, por translocações, fazendo com que os sítios de DNAr 18S tenham se alocado em outro cromossomo promovendo os diferentes perfis observados.

Em *L. nordenskjoldi* foi observada uma maior variabilidade na distribuição dos sítios de DNAr 18S, tanto no número quanto no par cromossômico portador, mostrando diferenças inter e intrapopulacionais. A variabilidade entre as duas populações (PNS e PNIG) de *L. nordenskjoldi* pode estar relacionada também com os habitats diferentes entre essas localidades, favorecendo a adaptação destes indivíduos, de modo a beneficiar um acúmulo independente nas alterações cromossômicas, como já foi observado por Forman *et al.* (2013) em aranhas da espécie *Wadicosa fidelis* e por Stahlavsky *et al.* (2018) em espécies de opiliões (Opiliones, Phalangidae).

*Lycosa nordenskjoldi* apresentou a maior variação na distribuição de heterocromatina, o que também pode explicar esse aumento nos pares cromossômicos portadores de sítios de DNAr 18S. De acordo com o trabalho de Cabral de Melo *et al.* (2011), espécies de coleópteros que possuíam maior quantidade de heterocromatina tinham também a ocorrência de mais sítios de 18S, sugerindo que estes dois componentes sofrem uma condição evolutiva semelhante. A proximidade dos sinais de hibridização nos núcleos interfásicos em *L. nordenskjoldi* (dados não mostrados) pode facilitar a ocorrência de eventos de transposição, envolvendo a translocação entre cromossomos e reposicionando os sítios.

Interessante notar que, apesar das variações observadas, as três espécies e suas diferentes populações possuem uma característica em comum, que é a localização do sítio de DNAr 18S no par 5, evidenciando um caráter conservado, pelo menos no que se refere às espécies do presente estudo, as únicas representantes do gênero com dados de DNAr 18S. Resultados semelhantes já foram descritos utilizando nitrato de prata, onde pode-se observar uma conservação de um dos pares

com AgRON em diferentes gêneros dentro de Lycosidae, como o par 3 em *Xerolycosa* (Wise, 1983) e o par 11 em *Arctosa* (Dolejš *et al.*, 2011).

Em nossas análises, sítios de Histona H3 foram observados somente em *L. erythrognatha*, localizados na região pericentromérica, ou seja, coincidente com a heterocromatina, o que pode sugerir uma evolução conjunta destas sequências. Entretanto, ainda serão necessários novos estudos para que se possa inferir como de fato está ocorrendo a evolução dessas sequências.

### Os Sistemas Cromossômico Sexuais e Hipótese Evolutiva em *Lycosa*

Durante as fases meióticas, desde o paquíteno até algumas células em metáfases II, os cromossomos sexuais apresentaram um comportamento bem característico nos machos das espécies, já visualizado em outros estudos com aranhas (Dolejš *et al.*, 2011; Král *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2015). Estes univalentes permanecem mais condensados que os cromossomos autossômicos, caracterizando uma heteropicnose positiva além de se manterem, na grande maioria das vezes, paralelos um ao outro, o que facilita muito sua identificação.

Como observado na **Tabela 1**, os números diploides ímpares foram originados por alterações no SCS, sejam elas relacionadas ao aumento ou à diminuição na quantidade desses cromossomos, e conseqüente mudança desse sistema. Como já mencionado anteriormente, o SCS do tipo  $X_1X_20$  é considerado ancestral para diversos grupos de aranhas, entre eles Lycosoidea (Dolejš *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2015) assim, os demais sistemas seriam considerados mais derivados dentro de Lycosidae.

Alguns autores como Král *et al.* (2006) e Araujo *et al.* (2012, 2014) já mostraram que esses SCS diferenciados coexistem e que estão presentes em mais de 45% das famílias analisadas no clado Entelegynae, e que a conversão de um sistema em outro é comum. Contudo, das 34 espécies de *Lycosa* descritas citogeneticamente (**Tabela 1**), somente em cinco delas a alteração no número diploide se deve a alterações envolvendo os cromossomos sexuais: *Lycosa barnesi* Gravely, 1924 -  $2n♂ = 27, X$ ; *Lycosa nordenskjoldi* Tullgren, 1905 -  $2n♂ = 19, X0$ ; *Lycosa* sp.  $2n♂ = 21, X_1X_2Y$ ; *Lycosa* (grupo *malitiosa*)  $2n♂ = 23, X0$  e *Lycosa* (grupo *thorelli*)  $2n♂ = 23, X_1X_2X_30$ .

A origem desses SCS diferenciados foi sugerida por diversos autores, por diferentes caminhos: 1) originados por fusões ou fissões envolvendo somente os cromossomos sexuais, tanto na conversão de sistemas  $X_1X_20$  em  $X_1X_2X_30$ , e vice-

versa, quanto na conversão de sistemas  $X_1X_20$  em sistemas simples do tipo  $X_0$  (Pátau, 1948; Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1981; Parida e Sharma, 1986); 2) por surgimento de um elemento supranumerário, na conversão de um SCS  $X_1X_20$  em  $X_1X_2X_30$  (Bole-Gowda, 1952); 3) ou envolvendo fusões entre os cromossomos sexuais com autossômicos, principalmente quando relacionado com a conversão de um SCS do tipo  $X_1X_20$  em  $X_1X_2Y$  (Král *et al.*, 2006). Embora a frequência não possa ser utilizada como caráter para determinar ancestralidade de um determinado SCS, a baixa ocorrência em *Lycosa* desses sistemas, até então derivados, reforça a hipótese de que o sistema  $X_1X_20$  seja ancestral para o gênero.

Diante da variabilidade cariotípica entre as espécies de *Lycosa* apresentadas neste estudo e dos dados disponíveis na literatura (**Tabela 1**), foi proposta uma hipótese evolutiva dos cariótipos no gênero, sem objetivar a relação filogenética entre as espécies, como esquematizado na **Figura 6**.

A partir do cariótipo ancestral em Lycosidae  $2n=28$ ,  $X_1X_20$ , que ocorre em 35% do total de espécies descritas em *Lycosa* (Araujo *et al.*, 2020), os demais cariótipos do gênero poderiam ter se originado através de sucessivos eventos de rearranjos cromossômicos.

Um dos primeiros eventos de alteração do conjunto cromossômico pode ocorrer pela fusão de cromossomos autossômicos/sexuais como proposto por Hackman (1948) surgindo cromossomos com morfologia metacêntrica, além de inversão pericêntrica (pós fusão) ou deleção parcial (Datta e Chatterjee, 1989, 1992), ou ainda uma fusão em *tandem*, dando origem a cromossomos acrocêntricos (Pekár e Král, 2001).

Quando o SCS ( $X_1X_20$ ) não é alterado, mas seu número diploide sim, sugere-se a ocorrência de rearranjos envolvendo fusão entre os cromossomos autossômicos, de forma a não afetar a morfologia cromossômica, como translocações simples ou fusão em *tandem*, mantendo assim o conjunto acro/telocêntrico. Tais rearranjos podem ter levado ao surgimento dos cariótipos com  $2n♂=26, 24, 22$  e  $18$ , como proposto na **Figura 6**.

Quando os grupos passavam por alterações no  $2n$  e no SCS, essa variação ocorreria de um número diploide par para um ímpar onde, a partir de um SCS  $X_1X_20$  se originavam os novos sistemas no gênero e os menos frequentes, até o momento:  $X_0$ ,  $X_1X_2X_30$  e  $X_1X_2Y$ .

O sistema  $X_1X_2X_30$  poderia ter surgido com a inserção de um cromossomo supranumerário no SCS  $X_1X_20$  de acordo com Bole-Gowda (1952) ou pela ocorrência de uma não disjunção cromossômica (Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1981; Datta e Chatterjee, 1988); e se ocorrer uma translocação entre cromossomos sexuais e autossômicos ocorreria a origem de um SCS  $X_1X_2Y$  (Rowell, 1990; Silva *et al.* 2002; Král *et al.*, 2006; Král, 2007).

Esses SCS mais derivados estariam surgindo por meio de eventos mais simples, onde a diminuição de número diploide e mudança no SCS viriam de um  $2n$  mais próximo, do que variadas fusões a partir do  $2n♂=28$ . Por exemplo,  $2n♂=22$ ,  $X_1X_20$  daria origem a  $2n♂=23$ ,  $X_1X_2X_30$ , pelo surgimento de um supranumerário e não múltiplos eventos de fusão/fissão.

Os cariótipos com  $2n♂=27$ ,  $X0$ ,  $2n♂=23$ ,  $X0$  e  $2n♂=19$ ,  $X0$  teriam surgido por meio de fusão exclusivamente entre cromossomos sexuais seguidos ou não de inversão pericêntrica como já citado anteriormente e esquematizado na **Figura 6**.

Esses SCS considerados derivados estão presentes em muitas outras famílias de aranhas e coexistem entre si, apesar das baixas ocorrências (Král *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2012,2014). Com os dados do presente estudo mais os da literatura foi possível apresentar uma proposta preliminar de eventos ocorridos durante a evolução do cariótipo de *Lycosa*, que podem evidenciar que suas espécies estão sujeitas a mecanismos diferentes de mudança. É claro que, com o aumento de dados citogenéticos neste grupo, outros SCSs poderão surgir envolvendo outros eventos evolutivos.

## Conclusão

Neste estudo, demonstrou-se uma ampla variação de características cromossômicas, entre e dentro das três espécies, evidenciada pelas diferenças entre a quantidade e localização dos sítios de DNAr 18S e das bandas heterocromáticas, mais observada no complexo de espécies agrupado em *L. nordenskjoldi*. Essa variabilidade sugere uma relação evolutiva complexa entre os cariótipos destas espécies marcada, provavelmente, por eventos de dispersão das sequências de DNA repetitivo. Este estudo trouxe também os primeiros dados com DNAr 18S em *Lycosa*, evidenciando-o como um importante marcador citogenético para as espécies agrupadas neste gênero, além de demonstrar a importância das aranhas como animais modelo para avaliação evolutiva dos Sistemas Cromossômicos Sexuais.

## Referências

- Akan Z, Varol I and Öztaşlan MA (2005) Cytotaxonomical investigation on spiders (Arachnida: Araneae). *Environ Biotechnol* 19:101-104.
- Araujo D, Rheims CA, Brescovit A and Cella DM (2008) Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res* 46(2):89-95.
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E and Cella DM (2012) Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. In: *Meiosis-Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. InTech, Rijeka, pp.87-108.
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC and Cella DM (2014) Comparative cytogenetics of seven Ctenidae species (Araneae). *Zoolog Sci* 31(2):83-88.
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC and Cella DM (2015) Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. *J. Arachnol.* 43:174-181.
- Araujo D, Sanches MB, Da Silva J, Lima GS, Nascimento EVJ, Giroti AM, Brescovit AD, Cella DM and Schneider MC (2016) Chromosomal analyses of Salticinae and Lyssomaninae reveal a broad occurrence of the  $2n\♂ = 28, X1X20$  karyotype within Salticidae. *J. Arachnol.* 44(2):148-152.
- Bole-Gowda BN (1952) Studies on the chromosomes and the sex-determining mechanism in four hunting spiders (Sparassidae). *Proc Zool Soc* 5(1) (March 1952): 51-70. ISSN 0373-5893
- Bole-Gowda BN (1958) A study of the chromosomes during meiosis in twenty-two species of Indian spiders. *Proc Zool Soc* 11(2):69-108.
- Brum-Zorrilla N and Cazenave AM (1974) Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Experientia* 30(1):94-95.
- Brum-Zorrilla N and Postiglioni A (1980) Karyological studies on Uruguayan Spiders I. Banding pattern in chromosomes of *Lycosa* species (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 54:149-153.
- Cabral-De-Mello DC, Oliveira SG, De Moura RC and Martins C (2011) Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet* 12(1):88.
- Carnoy JB (1885) La cytodierèse chez les arthropodes. *La Cellule* 1:191-440. ISSN 0008-8757

Chemisquy MA, Gil SGR, Scioscia CL and Mola LM (2008) Cytogenetic studies of three Lycosidae species from Argentina (Arachnida, Araneae). *Genet Mol* 31(4):857-867.

Chickering AM and Hard W (1935) Notes on the spermatogenesis of spiders. *Pap. Mich. Acad. Sci* 20:589-595.

Datta SN and Chatterjee K (1988) Chromosomes and sex determination in 13 araneid spiders of North-Eastern India. *Genetica* 76(2) (March 1988):91-99, ISSN 0016-6707

Datta SN and Chatterjee K (1989) Study of meiotic chromosomes of four hunting spiders of north eastern India. *Perspectives in Cytology and Genetics* 6:414-424. ISSN 0970-4507

Datta SN and Chatterjee K (1992) Chromosomes and sex determination in three species of spinner spiders from northeastern India. *Cell and Chromosome Research* 15(2):64-69.

De Oliveira EA, Bertollo LAC, Yano CF, Liehr T and De Bello Cioffi M (2015) Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species. *Mol Cytogenet* 8(1):56.

Diaz MO and Saez FA (1966) Karyotypes of South American Araneida. *Mem. Inst. Butantan Simp. Internac* 33(1):153-154.

Dolejš P, Kořínková T, Musilová J, Opatová V, Kubcová L, Buchar J and Král J (2011) Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca* and *Xerolycosa* (Araneae:Lycosidae). *Eur. J. Entomol.* 108:16.

Foelix RF. (2011) 'Biology of Spiders.' 3rd ed. Oxford University Press: New York.

Forman M, Nguyen P, Hula V and Král J (2013) Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenet Genome Res* 141(1):43-49.

Gonzaga MO, Santos AJ and Japyassú HF (2007) *Ecologia e comportamento de aranhas*. Interciência, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 400 pp.

Gorlova OYu, Gorlov IP, Nevo E and Logunov DV (1997) Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. *Bull. Br. Arachnol. Soc.* 10(7):249-252.

Hackman W (1948) Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. *Acta Zool. Fenn.* 54:1–101.

Hoefler CD, Persons MH and Rypstra AL (2008) Evolutionarily costly courtship displays in a wolf spider: a test of viability indicator theory. *Behav Ecol* 19:974–979.

HÖFER H and BRESOVIT AD (1997) Contribuição para o conhecimento da gama-diversidade de aranhas (Araneae) na Amazônia. *Papo de Aranha* 4: 6.

Kořínková T and Král J (2013) Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders. In: Spider Ecophysiology, W. Netwig (Ed.), Springer-Verlag Berlin, pp. 159-171.

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 Res* 15:863–879.

Král J, Musilová J, Štáhlavský F, Řezáč M, Akan Z, Edwards RL, Coyle FA and Almerje CR (2006) Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Res* 14(44):859-880.

Král J, Kořínková T, Forman M and Krkavcová L (2011) Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenet Genome Res* 133:43-66.

Král J, Kořínková T, Krkavcová L, Musilová J, Forman M, Herrera IMÁ, Haddad CR, Vítková M, Henriques S, Vargas JGP et al. (2013) Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biol J Linn Soc Lond* 109(2):377-408.

Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2):201-220.

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O and Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem* 87(7):433-438.

Mittal OP (1961) Chromosome number and sex mechanism in twenty-one species of the Indian spiders. *Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University* 12(3-4):271-273.

Mittal OP (1963) Karyological studies on the Indian Spiders I. A comparative study of the chromosomes and sex-determining mechanism in the family Lycosidae. *Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University* 14(1-2):59-86.

Navia JFF, Vizzareta RO and Yunque EL (2006) Observaciones Cromosómicas en la Araña *Lycosa* sp. (Arachnida). *El Antoniano* 111:91-92.

Parida BB and Sharma NN (1986) Karyotype and spermatogenesis in an Indian hunting spider, *Sparassus* sp. (Sparassidae: Arachnida) with multiple sex chromosomes. *Chromosome Inf Serv* 40: 28–30.

Parida BB and Sharma NN (1987a) Chromosome number, sex mechanism and genome size in 27 species of Indian spiders. *Chromosome Information Service* 43:11-13.

Parida BB and Sharma NN (1987b) Cytological studies on Indian Spiders I. Meiosis in three species of wolf spiders (Lycosidae: Arachnida). *Caryologia* 40(1-2):89-97.

Pätau K (1948) X-segregation and heterochromasy in the spider *Aranea reaumuri*. *Heredity* 2(1) (June 1948):77-100. ISSN 0018-067X

Pekár S and Král J (2001) A comparative study of the biology and karyotypes of two central European Zodariid spiders (Araneae, Zodariidae). *J. Arachnol.* 29(3):345-353. ISSN 0161-8202

Postiglioni A and Brum-Zorrilla N (1981) Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 56:47-53.

Rincão MP, Chavari JL, Brescovit AD and Dias AL (2017) Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comp Cytogenet* 11(4):627-639.

Rowell DM (1990) Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. *Genetica* 80(2) (February 1990):139-157. ISSN 0016-6707

Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27:190-193.

Schwarzacher T and Heslop-Harrison JS (2000) *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltda, Oxford, 199p.

Sharma N and Parida BB (1987) Study of chromosomes in spiders from Orissa. *Pranikee* 8:71-76.

Silva RW, Klisiowicz DR, Cella DM, Mangili OC and Sbalqueiro IJ (2002) Differential distribution of constitutive heterochromatin in two species of brown spider: *Loxosceles intermedia* and *L. Laeta* (Araneae, Sicariidae), from the metropolitan region of Curitiba, PR (Brazil). *Acta Biol. Paran.* 31(1-4):123-136, ISSN 0301-2123.

Sokolov II (1960) Studies on nuclear structures in spiders (Araneina). I. Karyological peculiarities in spermatogenesis. *Voprosy tsitologii i protistologii*, pp.160-186.

Srivastava MDL and Shukla S (1986) Chromosome number and sex-determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. *Chromosome Information Service* 41:23-26.

Šťáhlavský F, Opatova V, Just P, Lotz LN and Haddad CR (2018) Molecular technique reveals high variability of 18S rDNA distribution in harvestmen (Opiliones, Phalangidae) from South Africa. *Comp Cytogenet* 12(1):41-59.

Stratton GE and Uetz GW (1983) Communication via substratum-coupled stridulation and reproductive isolation in wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Anim. Behav* 31:164-172.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-6.

Suzuki S (1954) Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fiftyseven species of spiders belonging to seventeen families, with general

considerations on chromosomal evolution. *Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division 1*, 15:23-136. ISSN 0368-4113

Uetz GW (1991) Hábitat structure and spider foraging. *In: Bell, S. S., E. D. McCoy, and H. R. Mushinsky (eds.). Hábitat structure. The physical arrangement of objects in space* London: Chapman and Hall. Pp. 325-348.

Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA, Griswold CE, Hormiga G, Prendini L, Ramírez MJ, Zhang J, 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.

Wilder SM and Rypstra AL (2010) Males make poor meals: a comparison of nutrient extraction during sexual cannibalism and predation. *Oecologia* 162:617–625.

Wise D (1983) An electron microscope study of the karyotypes of two wolf spiders. *Can J Genet Cytol* 25:161-168.

### **Recursos da Internet**

Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E and Cella DM (2020) The spider cytogenetic database. Available in [www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase)

Rasband WS (1997-2018) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

Sakamoto Y and Zacaro AA (2009) LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, 2009.

World Spider Catalog (2020) World Spider Catalog. Version 19.5. Natural History Museum Bern, 2020. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2

**Tabela 1** – Análises Citogenéticas em *Lycosa* Latreille, 1804 – Tabela adaptada de Araujo *et al.*, 2020, e atualizada com dados deste estudo. 2n= número diploide, SCS= Sistema Cromossômico Sexual, A= acrocêntrico, St= subtlocêntrico, T= telocêntrico, Sm= submetacêntrico, M= metacêntrico, S= cromossomo supranumerário – PR = Paraná; SP = São Paulo

<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>SCS</b>	<b>Morfologia Cromossômica</b>	<b>Coleta Local/País</b>	<b>Referências</b>
<i>Lycosa barnesi</i> Gravely, 1924	27	X	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Lycosa bistriata</i> Gravely, 1924	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
<i>Lycosa carmichaelli</i> Gravely, 1924	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
<i>Lycosa chaperi</i> Simon, 1885	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Lycosa coelestis</i> L. Koch, 1878	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	24A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Nishihakushima/ Japão	Suzuki (1954)
<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	-----	Diaz; Saez (1966)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Buenos Aires, Entre Ríos, Mendoza, Misiones/ Argentina	Chemisquy <i>et al.</i> (2008)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Rio Claro, Boituva, Guarulhos (SP) / Brasil	Araujo <i>et al.</i> (2015)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Londrina, Guaraqueçaba, Foz do Iguaçu (PR) /Brasil	Neste estudo
<i>Lycosa madani</i> Pocock, 1901	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
<i>Lycosa nigrotibialis</i> Simon, 1884	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)

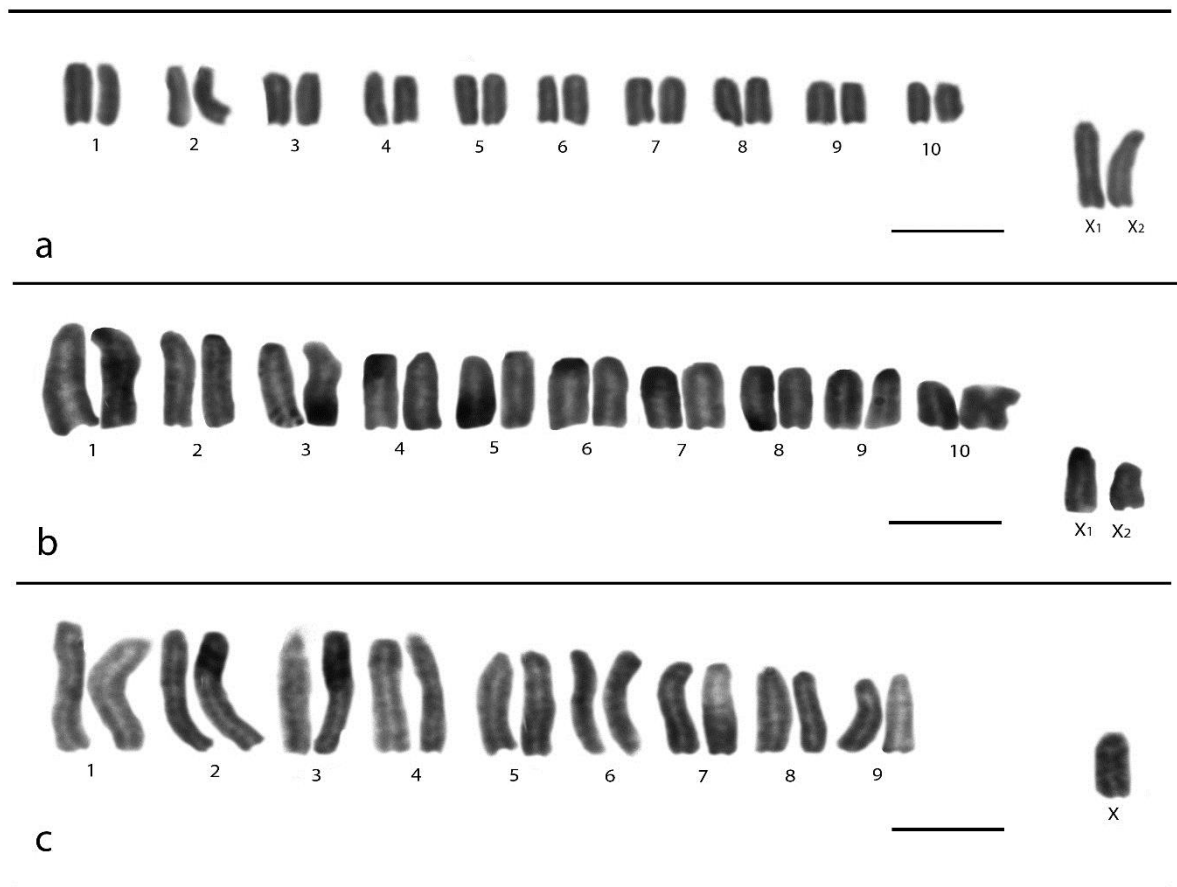
<i>Lycosa nordenskjoldi</i> Tullgren, 1905	19	X0	18A+XA	----	Diaz; Saez (1966)
	19	X0	18T+XT	Altônia (PR) / Brasil	Araujo <i>et al.</i> (2015)
	19	X0	18A+XA	Guaraqueçaba, Icaraíma, Porto Camargo (PR) /Brasil	Neste estudo
<i>Lycosa pampeana</i> Holmberg, 1876	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Buenos Aires/ Argentina	Chemisquy <i>et al.</i> (2008)
<i>Lycosa phipsoni</i> Pocock, 1899	-----	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-----	Índia	Mittal (1961)
<i>Lycosa praegrandis</i> C.L. Koch, 1836	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Deserto Negev/ Israel	Gorlova <i>et al.</i> (1997)
<i>Lycosa sericovittata</i> Mello-Leitão, 1939	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	São Roque, Tietê (SP) /Brasil	Araujo <i>et al.</i> (2015)
	26	-----	26T		
<i>Lycosa tarantula</i> (Linnaeus, 1758)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Londrina (PR)/ Brasil	Neste estudo
	18	-----	-----	Nizip, Burj Khalifa/Turquia	Akan <i>et al.</i> (2005)
<i>Lycosa thorelli</i> (Keyserling, 1877)	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Postiglioni (1980)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Montevidéu/Uruguai	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
<i>Lycosa</i> sp.	20-24	-----	----	França	Carnoy (1885) Chickering; Hard (1935)
	-----	X	----		
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Iwakuni/Japão	Suzuki (1954)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Calcutá/Índia	Bole-Gowda (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Hoshiarpur/Índia	Sharma <i>et al.</i> (1958)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	----	Sokolov (1960)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	26A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Índia	Mittal (1963)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Uruguai	Brum-Zorrilla; Postiglioni (1980)

	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> T	Montevidéo/Uruguay	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
	18	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Allahabad/Índia	Srivastava; Shukla (1986)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Allahabad/Índia	
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	20A+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Saheed Nagar,	Parida; Sharma (1987a, b)
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Bhubaneswar/ Índia	
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Índia	
	22	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Bhubaneswar/Índia	Sharma; Parida (1987)
	28	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	----	Gopalpur, Cuttack/Índia	
	21	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	16T+2St+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> M/Sm+YT	Bolognesi/Peru	Navia <i>et al.</i> (2006)
<i>Lycosa</i> sp. (grupo <i>malitiosa</i> )	23	X0	22T+XM	Canelones/Uruguay	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)
<i>Lycosa</i> sp. (grupo <i>thorelli</i> )	23	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0	20T+ X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> T	Montevidéo/Uruguay	Postiglioni; Brum-Zorrilla (1981)

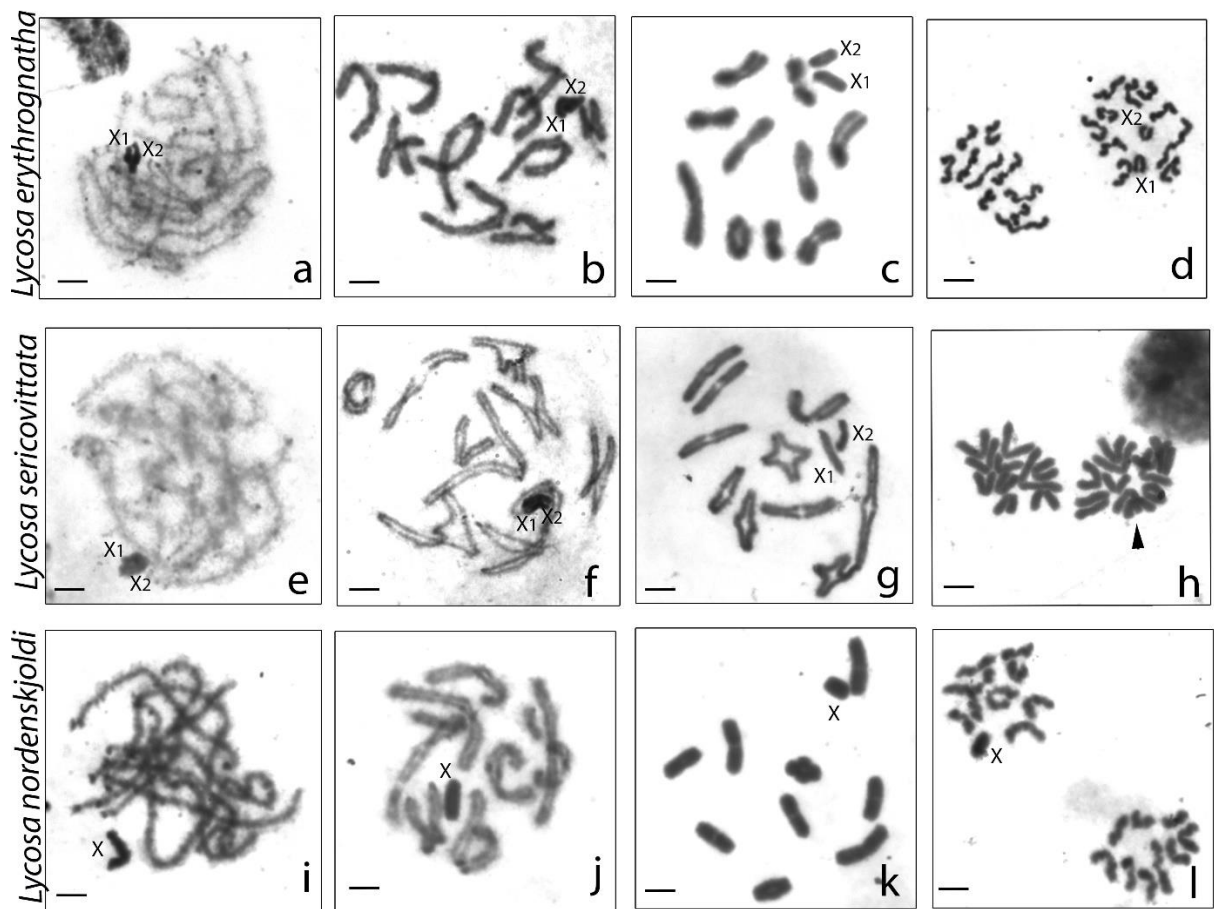
---

**Tabela 2** – Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG=Parque Estadual Mata dos Godoy; PNS=Parque Nacional de Superagui; UEL= Universidade Estadual de Londrina; PNIG=Parque Nacional de Ilha Grande; PNI = Parque Nacional do Iguaçu.

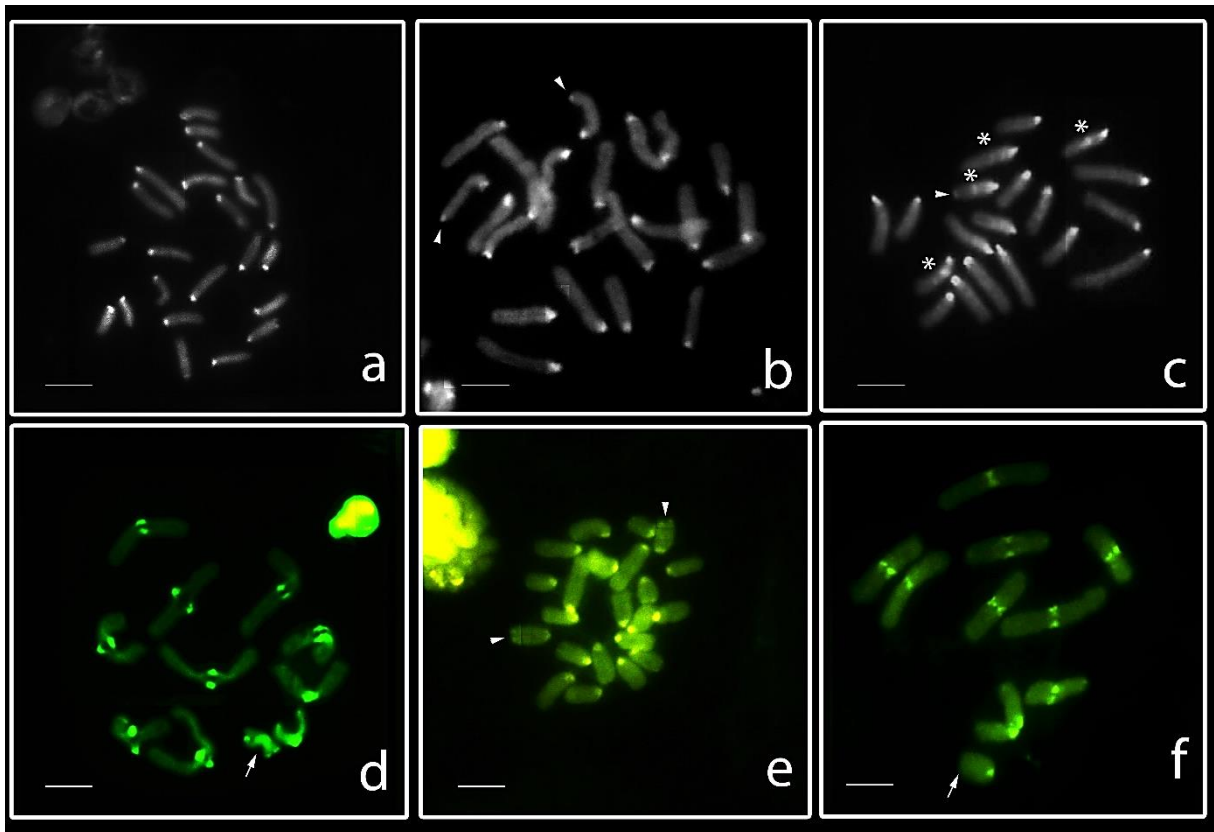
<b>Espécies</b>	<b>Amostras (♂)</b>	<b>Local de Coleta</b>
<i>Lycosa erythrognatha</i> Lucas, 1836	3	PEMG – Londrina, PR (23°26'22.92"S 51°14'26.66"O)
	15	PNS – Guaraqueçaba, PR (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)
	4	UEL – Londrina, PR (23°19'27.07"S 51°12'5.78"O)
	4	PNI – Foz do Iguaçu, PR (25°35'17.48"S 54°28'22.09"O)
<i>Lycosa</i> (gr. <i>nordenskjoldi</i> )	3	PNS – Guaraqueçaba, PR (25°21'4.31"S 48°12'3.27"O)
	4	PNIG - Icaraíma/Porto Camargo-PF (43° 22' 01,00"S 73° 46' 25,40"O)
<i>Lycosa sericovittata</i> Mello-Leitão, 1939	7	UEL – Londrina, PR (23°19'27.07"S 51°12'5.78"O)



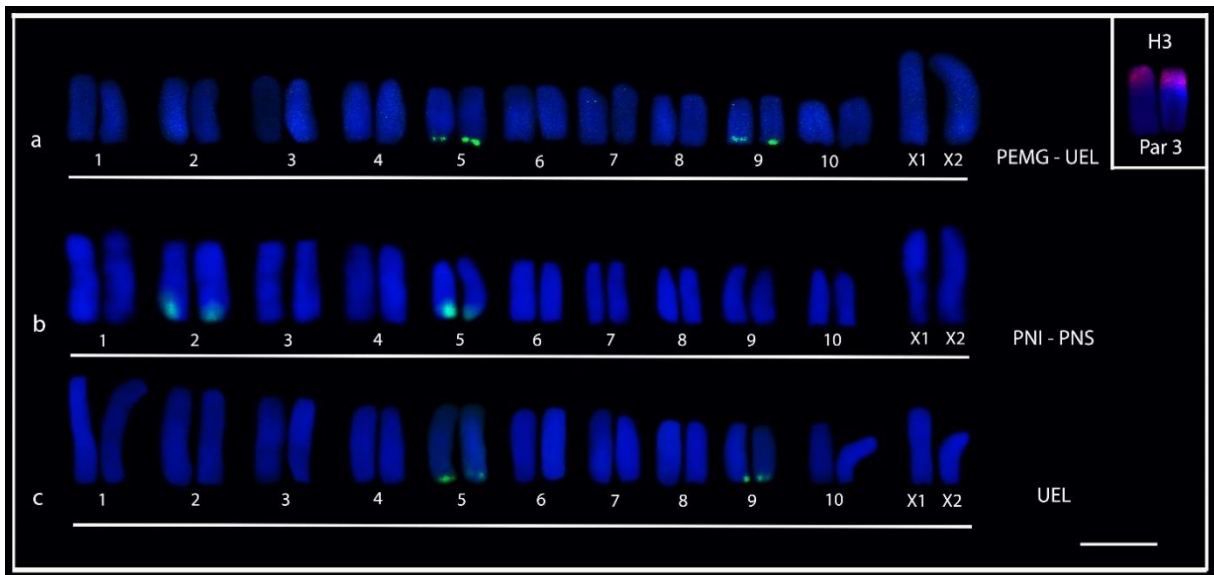
**Figura 1** – Cariótipos de machos das espécies de *Lycosa* corados com Giemsa **a** *Lycosa erythrognatha*,  $2n_{\text{♂}} = 22$ ,  $X_1X_2O$ . **b** *Lycosa sericovittata*,  $2n_{\text{♂}} = 22$ ,  $X_1X_2O$ . **c** *Lycosa nordenskjoldi*,  $2n_{\text{♂}} = 19$ ,  $XO$ . Barra= 10 $\mu\text{m}$



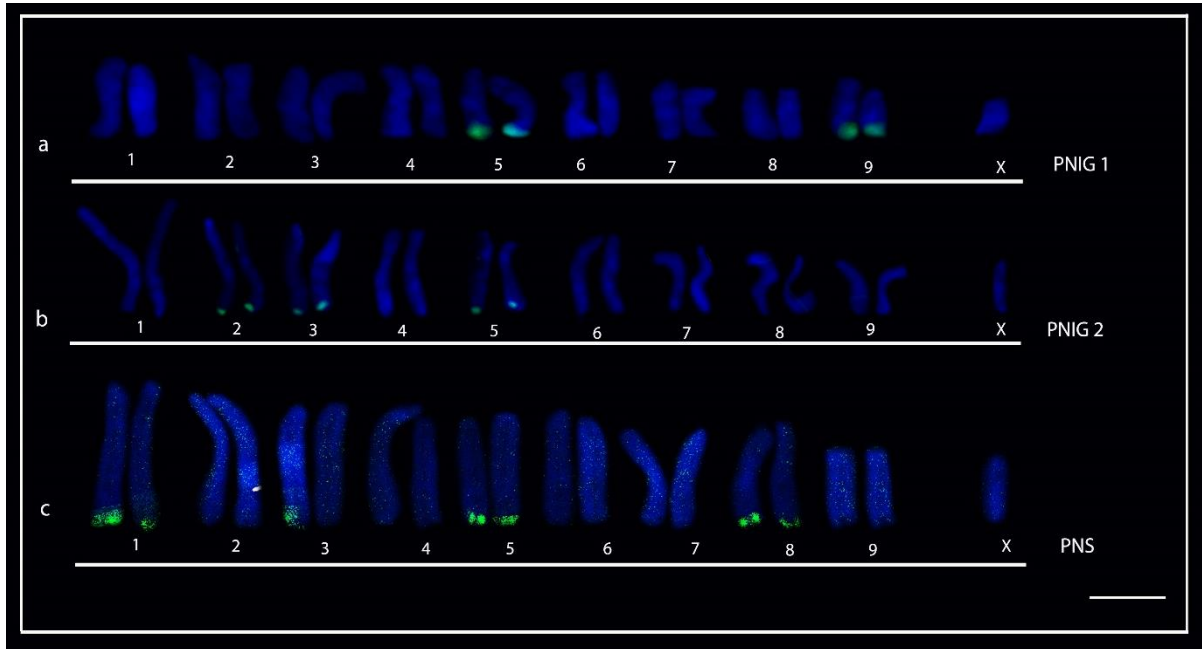
**Figura 2** - Células meióticas de machos de *Lycosa* coradas com Giemsa. **a-d** *Lycosa erythrognatha*; **e-h** *Lycosa sericovittata*; **i-l** *Lycosa nordenskjoldi*. Células em paquítenos (**a,e,i**) evidenciam os cromossomos sexuais heteropcnóticos positivos. Células em diplóteno mostrando os univalentes sexuais dispostos lado a lado (**b, f**) ou como um univalente isolado (**j**) todas células apresentando quiasmas, em sua maioria terminais nos autossomos. Células em diacinese comprovam o número de bivalentes e cromossomos sexuais em cada espécie: (**c**) *L. erythrognatha* e (**g**) *L. sericovittata* com 10 bivalentes autossômicos +  $X_1X_2O$  e (**k**) *L. nordenskjoldi* com 9 bivalentes autossômicos +  $XO$ . Células em metáfase II (**d,h,l**) mostram a migração conjunta dos cromossomos sexuais, podendo observar células com 12 e 10 cromossomos (**d,h**) e células com 10 e 9 cromossomos (**l**). As cabeças de seta indicam em (**h**) indicam a célula com maior número cromossômico. Barra = 10 $\mu$ m



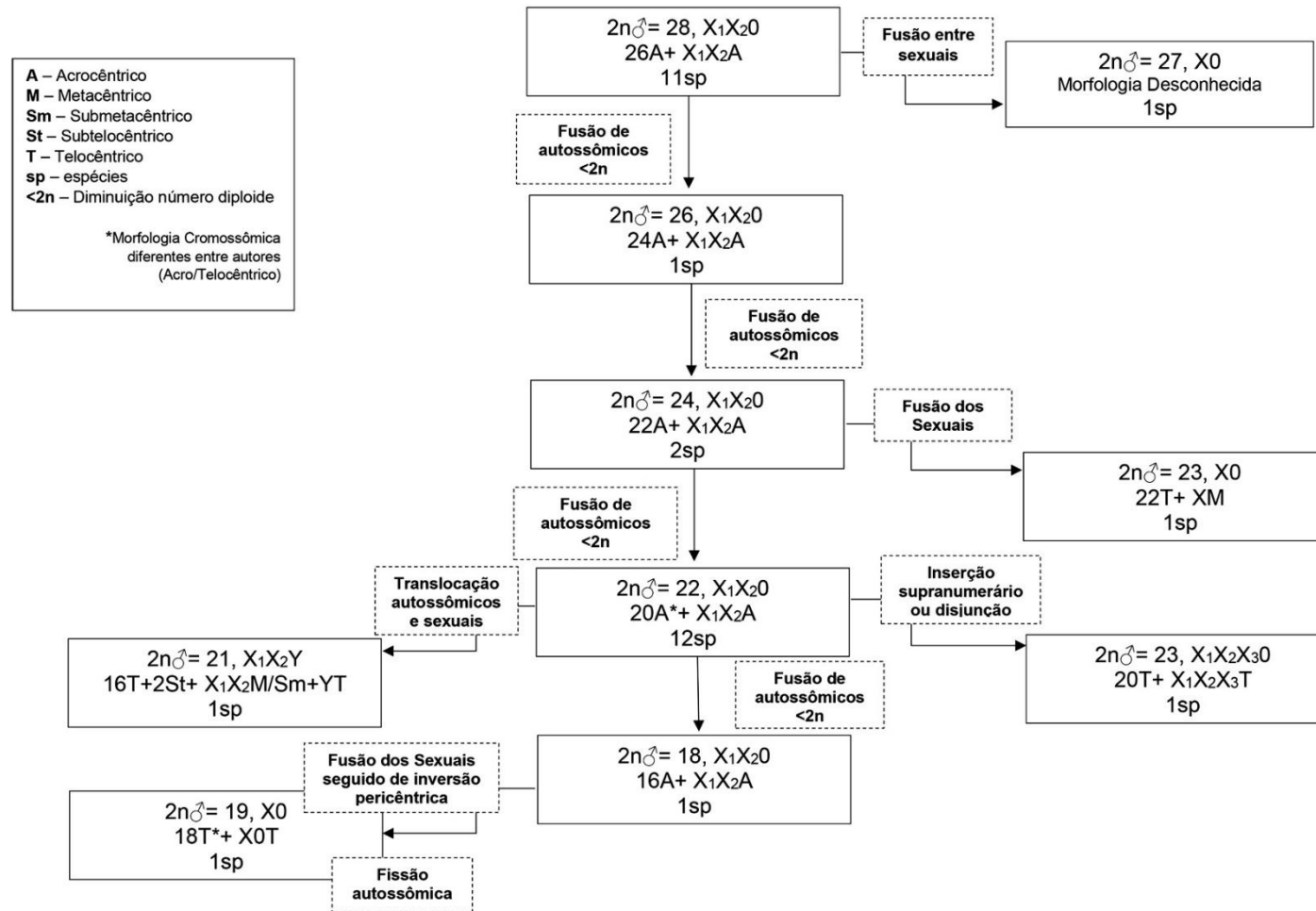
**Figura 3** – Células testiculares das três espécies de *Lycosa* submetidas a técnica de bandamento C (**a, b, c**) e coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (**d, e, f**). As setas indicam os cromossomos sexuais. Em **a, b, c**, metáfases mitóticas de *L. erythrognatha*, *L. sericovittata*, *L. nordenskjoldi*, respectivamente, mostrando marcações heterocromáticas pericentroméricas em todos os cromossomos. Em **(b)** podem ser evidenciadas algumas marcações terminais (cabeças de seta) e em **(c)** marcações intersticiais (asterisco). Em **(d)** célula em diacinese de *L. erythrognatha* com marcações pericentroméricas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Metáfase mitótica de *L. sericovittata* **(e)** com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pericentroméricas em todos os cromossomos: cabeças de setas indicam um par de cromossomos com marcação terminal. Em **(f)** célula em diplóteno de *L. nordenskjoldi* apresentando marcações pericentroméricas CMA<sub>3</sub> positivas em todos os cromossomos. Barra = 10µm



**Figura 4** – Cariótipos de machos de duas espécies de *Lycosa* submetidos a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda DNAr 18S (verde) e Histona H3 (vermelho). Em (a) *L. erythrognatha*, população Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e Campus Universidade Estadual de Londrina (UEL), mostrando os sítios de DNAr 18S nos pares 5 e 9; em (b) população do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) e Parque Nacional de Superagui (PNS) mostrando sítios de DNAr 18S nos pares 2 e 5; em (c) *L. sericovittata* população da UEL, com sítios de DNAr 18S nos pares 5 e 9. No box, o par 3 de Histona H3 de *L. erythrognatha* (PEMG). Barra = 10 $\mu$ m



**Figura 5** – Cariótipos de duas populações de *L. nordenskjoldi* submetidos a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. **(a)** indivíduo da população PNIG com sítios ribossomais nos pares 5 e 9; **(b)** indivíduo da população do Parque Nacional de Ilha Grande (PNIG) portador dos sítios de DNAr18S nos pares 2, 3 e 5; **(c)** população do Parque Nacional do Superagui (PNS) com sítios de DNAr 18S nos pares 1, 3, 5 e 8, sendo que o par 3 mostra marcação em apenas um dos homólogos. Barra = 10 $\mu$ m



**Figura 6** – Representação esquemática de uma possível evolução cariotípica dentro do gênero *Lycosa*. Os retângulos trazem os números diploide, morfologia cromossômica e quantidade de espécies portadoras destas características; os retângulos tracejados mostram os eventos responsáveis para o surgimento de cada complexo cariotípico; o sentido da seta indica de onde e para onde o evento ocorreu; e o quadrado à esquerda mostra a legenda referente às abreviações utilizadas.

## Capítulo 2

VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA ENTRE POPULAÇÕES  
DE *Trochosa* sp. (ARANEAE): OCORRÊNCIA DO MENOR NÚMERO  
DIPLOIDE EM LYCOSIDAE

Este artigo será submetido para publicação na revista  
**Biological Journal of the Linnean Society**

## Variação cromossômica entre populações de *Trochosa* sp (Araneae): ocorrência do menor número diploide em Lycosidae

Analiza Fernanda Cavenagh<sup>1</sup>, Matheus Pires Rincão<sup>1</sup>, Antonio Domingos Brescovit<sup>2</sup>, Ana Lúcia Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Animal (LACA) Departamento de Biologia Geral – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná – Brasil

<sup>2</sup>Laboratório Especial de Coleções Zoológicas – Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP - Brasil

### Resumo

Lycosidae é uma família de aranhas altamente diversa e bem distribuída. Suas espécies são de pequeno a médio porte conhecidas popularmente como aranhas de jardim. Apesar de ser uma das famílias mais bem estudadas, ainda possui uma lacuna relacionada a dados citogenéticos, onde apenas 5% de suas espécies foram analisadas. O gênero *Trochosa* está listado como o sétimo mais abundante em quantidade de espécies contudo, dados cromossômicos estão entre os mais escassos dentro de Lycosidae, e em território brasileiro ainda não existe nenhuma espécie analisada. Assim, este estudo tem por objetivo analisar os cariótipos de indivíduos de *Trochosa* em três populações do estado do Paraná. Para isso, foram realizadas análises convencionais com Giemsa e da distribuição e composição de heterocromatina. Os resultados mostraram que as populações de *Trochosa* sp., identificadas como pertencentes ao mesmo morfotipo, possuíam um conjunto cariotípico diferente: indivíduos do Parque Nacional de Iguaçu (PNI) com  $2n_{\text{♂}}=22, X_1X_20$  (acrocêntricos) e indivíduos de *Trochosa* sp do Parque Estadual Mata dos Godoy e Reserva Biológica das Perobas (PEMG/RBP) com  $2n_{\text{♂}}=11, X0$  (metacêntricos), demonstrando uma possível ocorrência de translocações Robertsonianas envolvendo todo o cariótipo, reduzindo o número diploide nestas duas populações pela metade. Os indivíduos apresentaram a heterocromatina distribuída nas regiões pericentroméricas em todos os cromossomos, com algumas variações entre eles, mostrando também marcações terminais, proximais e intersticiais. As populações apresentaram regiões  $CMA_3^+$  apenas no estágio de paquíteno. A distribuição diferenciada da heterocromatina pode estar associada a intensa mudança no cariótipo entre as populações, facilitando os rearranjos. Em nossas análises não foram observados indivíduos híbridos, o que poderia evidenciar uma nova espécie, entretanto, morfotipos entre indivíduos de uma mesma espécie em aranhas podem ocorrer.

**Palavras-chave:** Cariótipo; Citogenética de aranhas; Heterocromatina; Rearranjos cromossômicos.

## Introdução

*Trochosa* C. L. Koch, 1847 (Araneae) é um gênero composto por um grupo amplo de espécies, classificado como o sétimo gênero mais abundante de Lycosidae, com um total de 92 espécies, amplamente distribuído pelos continentes (Foelix, 2011; World Spider Catalog, 2020), encontradas com frequência em agro-ecossistemas e ambientes antrópicos (Munguía, 2013). Apesar de alguns autores considerar o gênero portador de características delineadas, ou seja, exclusivas para observação em um diagnóstico preliminar de identificação de espécies (Brady, 1979).

Estudos mais recentes, utilizando marcadores moleculares para análise filogenética dentro de Lycosidae (Murphy *et al.* (2006) e Piacentini e Ramírez 2019), tratam *Trochosa* como um grupo polifilético, uma vez que a família é um considerada muito recente, cujas espécies possuem morfologia ainda muito semelhante entre elas.

No território brasileiro ocorrem quatro espécies descritas de *Trochosa*: *T. melloi* Roewer, 1951; *T. paranaenses* (Mello-Leitão, 1937); *T. pardaloides* (Mello-Leitão, 1937) e *T. sericea* (Simon, 1898) e, apesar de estarem inseridas em uma das famílias mais bem estudadas citogeneticamente (Araujo *et al.*, 2020; World Spider Catalog, 2020), nenhuma delas possui caracterização cromossômica, até o momento.

Fora do território nacional, existem apenas três espécies de *Trochosa* com dados citogenéticos: *T. ruricola* (De Geer, 1778) com  $2n_{\text{♂}}=26$ ,  $X_1X_20$  (Hackman, 1948) e  $2n_{\text{♂}}=20$ ,  $X_1X_20$  (Tasdemir *et al.*, 2012); *T. spinipalpis* (F.O. Pickard-Cambridge, 1895) com  $2n_{\text{♂}}=26$ ,  $X_1X_20$  (Hackman, 1948; Zhenling *et al.*, 1997) no continente Europeu; *T. punctipes* (Gravely, 1924) com  $2n_{\text{♂}}=28$ ,  $X_1X_20$  (Sharma, 1961) no continente Asiático, mostrando variações em número diploide porém, mantendo o SCS característico da família ( $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$  macho/fêmea) que ocorre em 94% das espécies de Lycosidae e morfologia acro/telocêntrica (Araujo *et al.*, 2020).

Lycosidae é conhecida por ser muito diversa em número diploide, que oscila de 18 a 30 cromossomos e possui sistemas sexuais raros como o tipo  $X0$  encontrado em *Lycosa barnesi* Gravely, 1924 (Srivastava; Shukla, 1986), *Lycosa nordenskjoldi* Tullgren, 1905, *Hogna sternalis* (Bertkau, 1880) (Araujo *et al.*, 2015), *Lycosa* sp. (grupo *malitiosa*) (Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1981);  $X_1X_2X_30$  em *Lycosa* sp. (grupo *thorelli*) e  $X_1X_2Y$  *Lycosa* sp. (Navia *et al.*, 2006), ainda assim, a morfologia cromossômica é quase exclusivamente acrocêntrica em todas as espécies.

De acordo com Piacentini e Ramírez (2019), Lycosidae tem uma origem recente (50 milhões de anos), o que explica a ocorrência de incertezas filogenéticas entre os gêneros deste grupo de aranhas, incluindo *Trochosa*, que é o objeto deste estudo. Além disso, apesar deste gênero possuir poucas análises citogenéticas, já mostra uma variação de número diploide. Sendo assim, este estudo tem por objetivo analisar indivíduos de três populações de *Trochosa* sp., com morfologia idêntica, utilizando citogenética convencional e bandamento cromossômico, visando identificar relações cromossômicas interpopulacionais que possam mostrar possíveis variações dentro da espécie e auxiliar na citotaxonomia do grupo.

## **Materiais e Métodos**

Foram coletados 37 indivíduos de *Trochosa* sp., durante os anos de 2017 a 2019 em três localidades (**Tabela 1**). Para este estudo os indivíduos foram denominados de acordo com o local de coleta. Os espécimes foram depositados na coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas no Instituto Butantan (IBSP, curador A.D. Brescovit) em São Paulo – SP. As preparações cromossômicas foram feitas de acordo com o proposto por Araujo *et al.* (2008), com a utilização de testículos e ovários de aranhas jovens e adultos. As lâminas foram coradas com Giemsa 3%, sendo analisadas 30 células mitóticas e meióticas para determinação do número diploide. Os cromossomos tiveram sua morfologia classificada de acordo com o programa Image J (Rasband, 1997-2018) com o uso do plugin LEVAN (Sakamoto e Zacaro, 2009) da metodologia de Levan *et al.* (1964). As lâminas foram submetidas à técnica de bandamento C de acordo com Sumner (1972), coradas com iodeto de propídeo (Lui *et al.*, 2012), para determinação da distribuição e composição de heterocromatina. Foram utilizados fluorocromos base-específicos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4,6'-diamidino-2'fenilindol (DAPI) segundo o protocolo de Schweizer (1980).

Por fim, todas as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com câmera digital Moticam Pro 282B. As imagens foram capturadas usando o programa Motic Images Advanced, versão 3.2.

## **Resultados**

Os indivíduos de *Trochosa* sp. Parque Nacional do Iguaçu (PNI) apresentaram  $2n_{\text{♂}} = 22$ , SCS X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0, e cromossomos de tamanho médio, sendo todos de morfologia

acrocêntrica (**Figura 1a**). Nos indivíduos de *Trochosa* sp. Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) / Reserva Biológica das Perobas (RBP) foi observado  $2n♂=11$  com SCS  $X_0$ , sendo o X um cromossomo de tamanho pequeno em relação aos demais componentes do complemento cariotípico, e todos de morfologia exclusivamente metacêntrica (**Figura 1 b**).

Nas células meióticas de todos indivíduos de *Trochosa* sp., pode-se observar em paquíteno, os univalentes sexuais facilmente identificados, devido sua alta condensação, apresentando heteropicnose positiva (**Figura 2a, e**).

As células em diplóteno de *Trochosa* sp. PNI mostram 10 bivalentes autossômicos e dois univalentes sexuais ( $10II+X_1X_20$ ) (**Figura 2b**). As células de *Trochosa* sp. PEMG/RBP apresentaram 5 bivalentes autossômicos e um univalente sexual ( $5II+X_0$ ) (**Figura 2f**). Em metáfase I e diacinese os univalentes sexuais foram observados dispostos lado a lado ou muito próximos (**Figura 2c**).

As células em anáfase II mostraram 10 e 12 cromossomos em *Trochosa* sp. PNI, com os univalentes sexuais migrando para o mesmo polo, confirmando o SCS  $X_1X_20$  (**Figura 2d**); em *Trochosa* sp. PEMG/RBP células em metáfases II apresentaram 5 e 6 cromossomos, confirmando o SCS  $X_0$  (**Figura 2h**).

As células submetidas ao bandamento C, mostraram marcações heterocromáticas em todos os cromossomos (**Figura 3a, c**), não sendo evidenciadas variações entre as populações. As *Trochosa* sp. PNI e PEMG/RBP mostraram uma maioria das marcações terminais e pericentroméricas com algumas regiões intersticiais.

A coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou em células de paquíteno algumas regiões com marcações positivas, ou seja, ricas em pares de base GC (**Figura 3b, d**). Nas fases onde os cromossomos estão altamente condensados não se evidenciaram sinais de marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (dados não mostrados).

## Discussão

Os cariótipos observados nos indivíduos de *Trochosa* sp., analisados no presente estudo, sugerem a ocorrência de duas espécies distintas, com a presença de  $2n♂=22$ ,  $X_1X_20$  nos indivíduos coletados no PNI e de  $2n♂=11$ ,  $X_0$  nas duas outras localidades, sugerindo uma redução do número diploide pela metade, indicando fusões cêntricas, provavelmente por translocação Robertsoniana, uma vez que o cariótipo com 22 cromossomos é todo composto por cromossomos acro/telocêntricos.

O fato de terem sido realizadas coletas em três anos distintos e, mesmo assim, não terem sido encontrados indivíduos híbridos, reforça a hipótese que o evento que deu origem ao cariótipo diferenciado em *Trochosa* sp. do PEMG e da RBP pode ter contribuído para o isolamento reprodutivo desses indivíduos, tendo ocorrido em uma época relativamente recente, uma vez que apenas um único morfotipo foi identificado.

A ocorrência de espécies crípticas não é um fenômeno tão raro em aranhas, tendo visto que estudos moleculares já apontaram indícios de sua ocorrência em Lycosidae, como *Aglaoctenus lagotis* (Holmberg, 1876) (Macrini *et al.*, 2015). Se tratando de uma família de origem recente, cuja diversificação data de aproximadamente 50 milhões de anos (Piacentini e Ramírez, 2019), ocupando ambientes campestres e de savana, quase que exclusivamente, o que explicaria a manutenção de características morfológicas muito conservadas nos gêneros da família, refletidas nos diversos problemas filogenéticos ainda não resolvidos dentro do grupo (Wheeler *et al.*, 2016, Albo *et al.*, 2017, Piacentini e Ramírez, 2019).

O conjunto cromossômico evidenciado nos indivíduos de *Trochosa* sp., difere dos trabalhos já apresentados para espécies do gênero como em *T. ruricola* (De Geer, 1778) com  $2n♂=26$ ,  $X_1X_20$  (Hackman, 1948) e  $2n♂=20$ ,  $X_1X_20$  (Tasdemir *et al.*, 2012); *T. punctipes* (Gravely, 1924) com  $2n♂=28$ ,  $X_1X_20$  (Sharma, 1961); *T. spinipalpis* (F.O. Pickard-Cambridge, 1895) com  $2n♂=26$ ,  $X_1X_20$  (Hackman, 1948; Zhenling *et al.*, 1997). A espécie do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) apresentou características cromossômicas observadas nas outras *Trochosa*, inclusive sua morfologia exclusivamente acro/telocêntrica e um “padrão” recorrente nas demais espécies de Lycosidae. Já os indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e da Reserva Biológica das Perobas (RBP) mostraram dados inéditos dentro do grupo de licosídeos, como o menor número diploide ( $2n♂=11$ ) e um conjunto total de cromossomos metacêntricos.

Dentro da família o número diploide varia de 18 a 30 cromossomos e o SCS  $X_1X_20$  está presente em 94% das espécies (Araujo *et al.*, 2020), mostrando que vem acontecendo uma tendência evolutiva cromossômica em Lycosidae, onde ocorre a redução do número diploide com a conservação do SCS, já que o  $2n♂=22$ , por exemplo, ocorre em 20% das espécies dentro da família. E essa redução é observada em outros grupos de aranhas, onde se pode notar que números diploides equivalentes a 20 cromossomos ou menos já são observados em 22 das 74 famílias analisadas, ou seja, aproximadamente 30%, e que somente seis delas, até o momento, possuem

espécies com um  $2n$  igual ou menor que 11: Dysderidae, Oonopidae, Oxyopidae, Pholcidae, Segestriidae e Uloboridae (Araujo *et al.*, 2020).

As três espécies brasileiras de aranhas que mostram um padrão de número diploide baixo, também possuem um SCS  $X_0$  equivalente ao apresentado em *Trochosa* sp. PEMG/RBP: *Oxyopes salticius* Hentz, 1845 com  $2n_{\text{♂}} = 11$ ,  $X_0$  (Oxyopidae) (Stávale *et al.*, 2011) e *Micropholcus piaui* e *M. ubajara* Huber, Carvalho & Benjamin, 2014 com  $2n_{\text{♂}} = 9$ ,  $X_0$  (Pholcidae) (Lomazi *et al.*, 2018), e seu complexo cariotípico mostra uma morfologia meta/submetacêntrica, quase que exclusiva. Esta morfologia é considerada mais basal e pode ser encontrada em espécies de Mygalomorphae (Řezáč *et al.*, 2006) e do clado Haplogynae. Já nas aranhas pertencentes ao clado Entelegynae, considerado como mais derivado, e onde estão inseridas as aranhas deste estudo, se observa uma ocorrência mais ocasional desta morfologia (Král *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2020).

Este tipo de morfologia diferenciada (Meta/Submetacêntrica ou Subtelocêntrica) é observada em algumas espécies da família entretanto, somente em um ou outro par cromossômico como: *Arctosa alpigena* (Doleschall, 1852); *A. alpigena lamperti* Dhal, 1908 (Dolejš *et al.*, 2011), *Evippa praelongipes* (O. Pickard-Cambridge, 1871) (Gorlova *et al.*, 1997), *Lycosa* sp. (gr. *malitiosa*) (Postiglioni & Brum-Zorrilla, 1981), *Lycosa* sp. (Navia *et al.*, 2006) e *Pardosa palustres* (Linnaeus, 1758) (Hackman, 1948). Casos mais discrepantes, como o visualizado em *Trochosa* sp. PEMG/RBP ainda são raros, porém já foi observado em *Argyrodes elevatus* Taczanowski, 1873, uma espécie da família Theridiidae, (Stávale *et al.* 2010). Os autores sugeriram que a formação desse conjunto cariotípico não provinha de alterações no número de pares cromossômicos, mas sim uma mudança do SCS, onde o  $X_0$  derivaria do sistema  $X_1X_20$ , após uma translocação Robertsoniana, e que o restante do conjunto autossômico resultou de inversões pericêntricas, ou uma possível adição de heterocromatina constitutiva.

Dolejš *et al.* (2011) ressaltam uma ideia semelhante de que, durante a evolução de alguns licosídeos o número diploide foi diminuindo, e o evento estaria relacionado a fusões em tandem (Suzuki, 1954) ou fusões seguidas de subsequentes inversões pericêntricas (White, 1973; Datta e Chatterjee, 1989), ou seja, era observado um conjunto menor de cromossomos, mas sua morfologia continuava acro/telocêntrica. No caso da *Trochosa* sp. PEMG/RBP a ocorrência de translocações Robertsonianas

ou fusões “tudo ou nada” (Painter, 1914), poderiam ser os eventos mais prováveis para a formação deste morfotipo, como proposto por Stávale *et al.* (2010, 2011).

Apesar do número diploide ser considerado como uma característica importante para a definição de uma espécie (White, 1973; King, 1993), já existem grupos animais que apresentam variações relacionadas tanto a número diploide quanto morfologia cromossômica (Lukhtanov *et al.*, 2011). Estes autores trouxeram que a fixação de rearranjos cromossômicos é comum na natureza e que pode ocorrer em gêneros que possuem espécies com números cromossômicos variados entre si, resultando em grupos polimórficos que, com o tempo, vão eliminando morfologias cariotípicas intermediárias. Isto já foi visualizado em outros grupos como insetos, aranhas e peixes (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004; Sharp e Rowell, 2007; McAllister *et al.*, 2008).

Dentro do grupo das aranhas um exemplo interessante é o da espécie *Delena cancerides* Walckenaer, 1837, da Austrália, analisada por Sharp e Rowell (2007), que possui muitos exemplares com  $2n_{\text{♂}}=43$ ,  $X_1X_2X_30$  e morfologia acro/telocêntrica, mas também outras 16 fórmulas cromossômicas, as quais, devido a ocorrência de híbridos, ainda não podem ser consideradas espécies diferentes. Segundo os autores, alguns fatores podem ser responsáveis por essa variabilidade cariotípica, como elementos transponíveis levando a variadas fusões.

Em nosso estudo, os indivíduos de *Trochosa*, foram classificados morfologicamente como sendo a mesma espécie (A. D. Brescovit, comunicação pessoal) entretanto, apresentaram morfologia cariotípica bem diferente entre as populações. Contrário a Sharp e Rowell (2007), não foram identificados híbridos entre os indivíduos de *Trochosa*, o que pode sugerir que eles realmente tenham se tornado espécies diferentes. Entretanto, a ocorrência de morfotipos no grupo das aranhas não é algo tão raro, e indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar cariótipos diferentes (Rowell, 1990; Stávale *et al.*, 2011).

Apesar da diferença cariotípica entre as populações de *Trochosa* sp., a distribuição de heterocromatina entre elas é semelhante, mostrando concentração principalmente em regiões pericentroméricas e terminais, com esta última sendo observada na família somente em *Lycosa* sp (Brum-Zorrilla e Postiglioni, 1980), até o momento.

Segundo Brum-Zorrilla e Postiglioni (1980), a ocorrência de pequenos blocos heterocromáticos pericentroméricos nas espécies de licosídeos analisadas,

ocasionaria uma possível proteção do cariótipo, mantendo-o constante durante sua evolução, pois a heterocromatina tem participação no processo de organização e estabilização de centrômeros e telômeros. A dispersão de heterocromatina no conjunto cromossômico, ao contrário, facilita as quebras e rearranjos uma vez que estes ocorrem preferencialmente nessas regiões (Karpen, 1994; Henikoff, 2000; Huisinga *et al.*, 2006).

Araujo *et al.* (2005) estudando *Nephilengys cruentata* (Fabricius, 1775) Tetragnathidae, propuseram que as regiões intersticiais observadas nesta espécie, esteja relacionada com rearranjos cromossômicos, como duplicações e inversões. Assim como Paula-Neto *et al.* (2017), que observaram em espécies de aranhas Filistatidae, que a diferenciação entre o  $2n$  e a dispersão/acúmulo de heterocromatina estava relacionada à variabilidade evidenciada entre os cariótipos. O mesmo pode estar ocorrendo nos indivíduos de *Trochosa*, cuja heterocromatina se mostra mais dispersa pelo cromossomo que as demais espécies estudadas na família (para revisão consulte Dolejš *et al.*, 2011), reforçando que a mudança na quantidade de heterocromatina e sua dispersão estaria associada ao aparecimento de novos conjuntos cromossômico, como observado em *Trochosa* sp. PEMG/RBP.

Dolejš *et al.* (2011) relataram em espécies de Lycosidae um possível padrão de distribuição da heterocromatina, disposta nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e, em alguns casos, pequenos blocos teloméricos, e que as regiões pericentroméricas eram ricas em pares de base GC. Os nossos dados mostram uma distribuição de heterocromatina um pouco mais diferenciada, com marcações mais dispersas em vários cromossomos. E em fases de paquíteno, isto é, com menor condensação, pequenos pontos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> foram observados, indicando a ocorrência de regiões GC ricas nos cromossomos de *Trochosa*.

Este estudo evidenciou dois novos números diploides no gênero, além de trazer o menor  $2n$  dentro de Lycosidae, com um conjunto cariotípico exclusivo metacêntrico nunca antes observado no grupo. Nossos dados ampliam as análises citogenéticas em *Trochosa*, aumentando o número de espécies analisadas e trazem evidências cariotípicas de que, os indivíduos do PNI e os do PEMG/RBP pertençam a diferentes espécies. Novos estudos morfológicos, citogenômicos e moleculares se fazem necessários, para um melhor esclarecimento da sistemática e da estrutura cariotípica destes indivíduos de *Trochosa*.

## Referências

- Albo MJ, Bidegaray-Batista L, Bechsgaard J, da Silva ELC, Bilde T, Pérez-Miles F. 2017. Molecular phylogenetic analyses show that Trechaleidae and Lycosidae are sister groups. *Arachnology* 17:169-176.
- Araujo D, Cella DM, Brescovit AD. 2005. Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. *Brazilian Journal of Biology* 65: 193-202.
- Araujo D, Rheims CA, Brescovit AD, Cella DM. 2008. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 89-95.
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM. 2015. Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. *The Journal of Arachnology* 43: 174-181.
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. 2020. *The spider cytogenetic database*. Disponível em: [www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase)
- Brady AR. 1979. Nearctic species of the wolf spider genus **Trochosa** (Araneae: Lycosidae). *Psyche: A Journal of Entomology* 86: 167-212.
- Brum-Zorrilla N, Postiglioni A. 1980. Karyological studies on Uruguayan spiders I. Banding pattern in chromosomes of *Lycosa* species (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 54: 149-153.
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L. 2005. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends in Genetics* 21:673-682.
- Datta SN, Chatterjee K. 1989. Study of meiotic chromosomes of four hunting spiders of north eastern India. *Perspectives in Cytology and Genetics* 6: 417-424.
- 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: 1-16.
- Foelix RF. 2011. *Biology of Spiders.* 3rd ed. Oxford University Press: New York.
- Gorlova OY, Gorlov IP, Nevo E, Logunov DV. 1997. Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. *Bulletin-British Arachnological Society* 10: 249-252.
- Hackman W. 1948. Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der geschlechtschromosomen. *Acta Zoologica Fennica* 54: 1-101.
- Henikoff S. 2000. Função da heterocromatina em genomas complexos. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1470: O1-8.

- Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SCR. 2006. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115: 110-122.
- Karpen GH. 1994. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 4: 281-291.
- King M. 1993. *Species Evolution: The Role of Chromosomal Change* Cambridge. Cambridge University Press.
- 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: 377-408.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lomazi RL, Araujo D, Carvalho LS, Schneider MC. 2018. Small pholcids (Araneae: Synspermiata) with big surprises: the lowest diploid number in spiders with monocentric chromosomes. *Journal of Arachnology* 46: 45-49.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438.
- Lukhtanov VA, Dinca V, Talavera G, Vila R. 2011. Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White Butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1-11.
- Macrini CMT, Peres EA, Solferini VN. 2015. Cryptic diversity of *Agloactenus lagotis* (Araneae, Lycosidae) in the Brazilian Atlantic rainforest: evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Applied Biology Biotechnology* 3: 009-014.
- McAllister BF, Sheeley SL, Mena PA, Evans AL, Schlötterer C. 2008. Clinal distribution of a chromosomal rearrangement: a precursor to chromosomal speciation? *Evolution* 62: 1852-1865.
- Munguía WP. 2013. Phylogenetic relationships of the wolf spider genus *Orinocosa* Chamberlin, 1916: (Araneae, Lycosidae) no publication. Master's thesis, Pontificia Universidad Cattolica do Rio Grande do Sul.
- Murphy NP, Framenau VW, Donnellan SC, Harvey MS, Park YC, Austin AD. 2006. Phylogenetic reconstruction of the wolf spiders (Araneae: Lycosidae) using sequences from the 12S rRNA, 28S rRNA, and NADH1 genes: implications for classification, biogeography, and the evolution of web building behavior. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:583-602.
- Navia JFF, Vizzareta RO, Yunque EL. 2006. Observaciones Cromosómicas en la Araña *Lycosa* sp. (Arachnida). *El Antoniano* 111: 91-92.

- Painter TS. 1914. Spermatogenesis in spiders. *Zoologische Jahrbücher' Abteilung Für Anatomie Und Ontogenie Der Tiere* 38: 509-576.
- Paula-Neto E, Cella DM, Araujo D, Brescovit AD, Schneider MC. 2017. Comparative cytogenetic analysis among filistatid spiders (Araneomorphae: Haplogynae). *The Journal of Arachnology* 45: 123-129.
- Piacentini LN, Ramírez MJ. 2019. Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Molecular phylogenetics and Evolution* 136: 227-240.
- Postiglioni A, Brum-Zorrilla N. 1981. Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 56: 47-53.
- Rasband WS. 1997-2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Rezáč M, Král J, Musilová J, Pekár S. 2006. Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143: 123-129. ISSN 0018-0661
- Rowell DM. 1990. Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. *Genetica* 80: 139-157.
- Sakamoto Y, Zacaro AA. 2009. LEVAN, an Image J plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Sharma T. 1961. A study on the chromosomes of two lycosid spiders. *Proceedings of the Zoological Society* 14: 33-38.
- Sharp HE, Rowell DM. 2007. Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in an Australian spider. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 2427-2439.
- Schweizer D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 27: 190-193.
- Shimabukuro-Dias CK, Oliveira C, Foresti F. 2004. Karyotype variability in eleven species of the catfish genus *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 15:135-146.
- 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: 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: 752-763.

Srivastava MDL, Shukla S. 1986. Chromosome number and sex-determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. *Chromosome Information Service* 41:23-26.

Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-6.

Suzuki S. 1954. Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fiftyseven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *Journal of Science of the Hiroshima University* 15: 23-136. ISSN 0368-4113

Taşdemir B, Varol I, Akpınar A. 2012. Cytotaxonomical studies on six species of spiders (Arachnida: Araneae) from Turkey. *Türkiye entomoloji bülteni* 2: 55-59.

Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA, Griswold CE, Hormiga G, Prendini L, Ramírez MJ, Sierwald P, Almeida-Silva L, Arnedo MA, Silva LRB, Benjamin SP, Bond JE, Grismado CJ, Hasan E, Hedin M, Izquierdo MA, Labarque FM, Ledford J, Lopardo L, Maddison WP, Miller JA, Piacentini LN, Platnick NI, Polotow D, Silva-Dávila D, Scharff N, Szuts T, Ubick D, Vink CJ, Wood HM, Zhang J. 2016. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics* 33: 574-616.

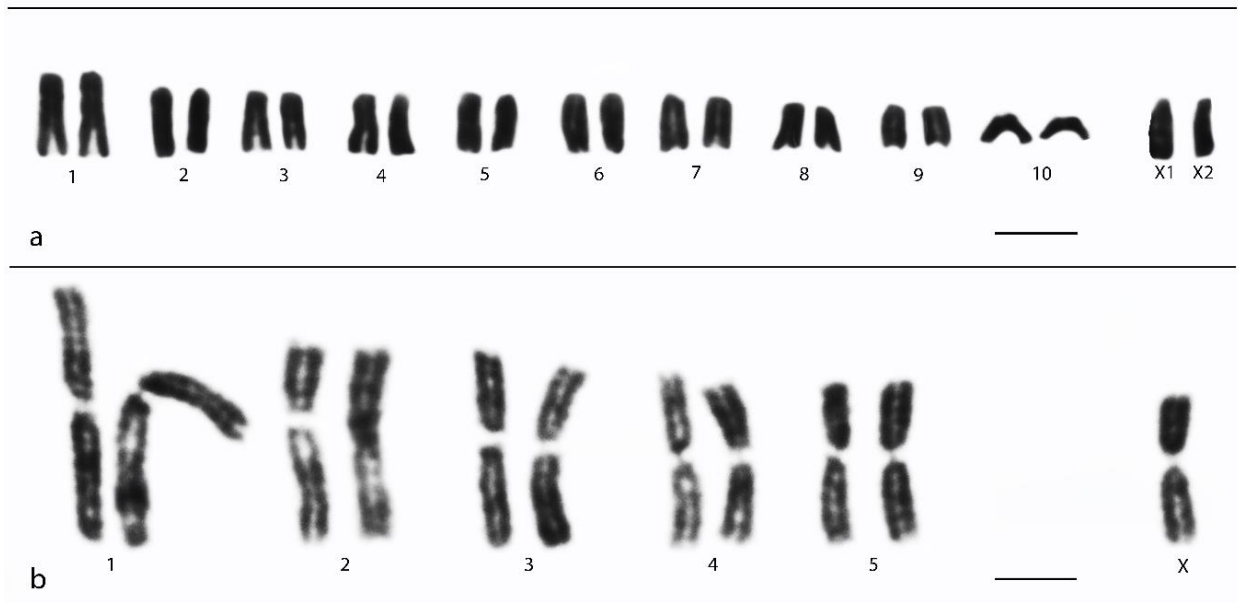
White MJD. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 961 pp.

World Spider Catalog. 2020. World Spider Catalog. Version 19.5. Natural History Museum Bern. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2

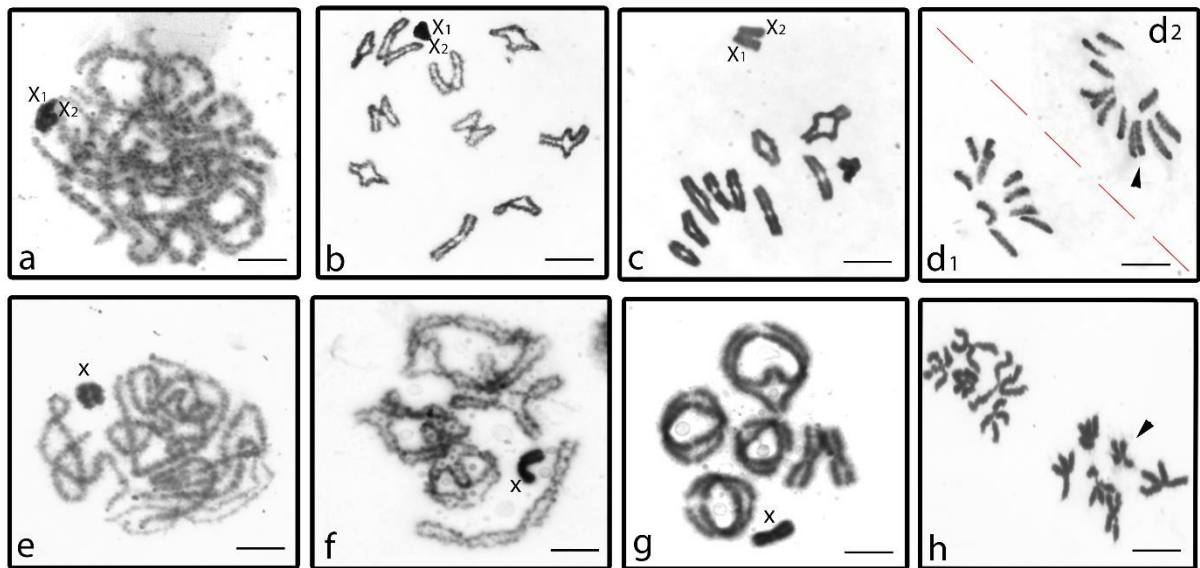
Zhenling Y, Xiuzhen W, Youju W, Sujuan C. 1997. On the karyotype of *Pirata piratoides* (Araneae: Lycosidae). *Acta Arachnologica Sinica* 6: 23-25.

**Tabela 1** - Espécies analisadas e locais de coleta. PR = Paraná; PEMG=Parque Estadual Mata dos Godoy; PNI= Parque Nacional do Iguaçu; RBP= Reserva Biológica das Perobas.

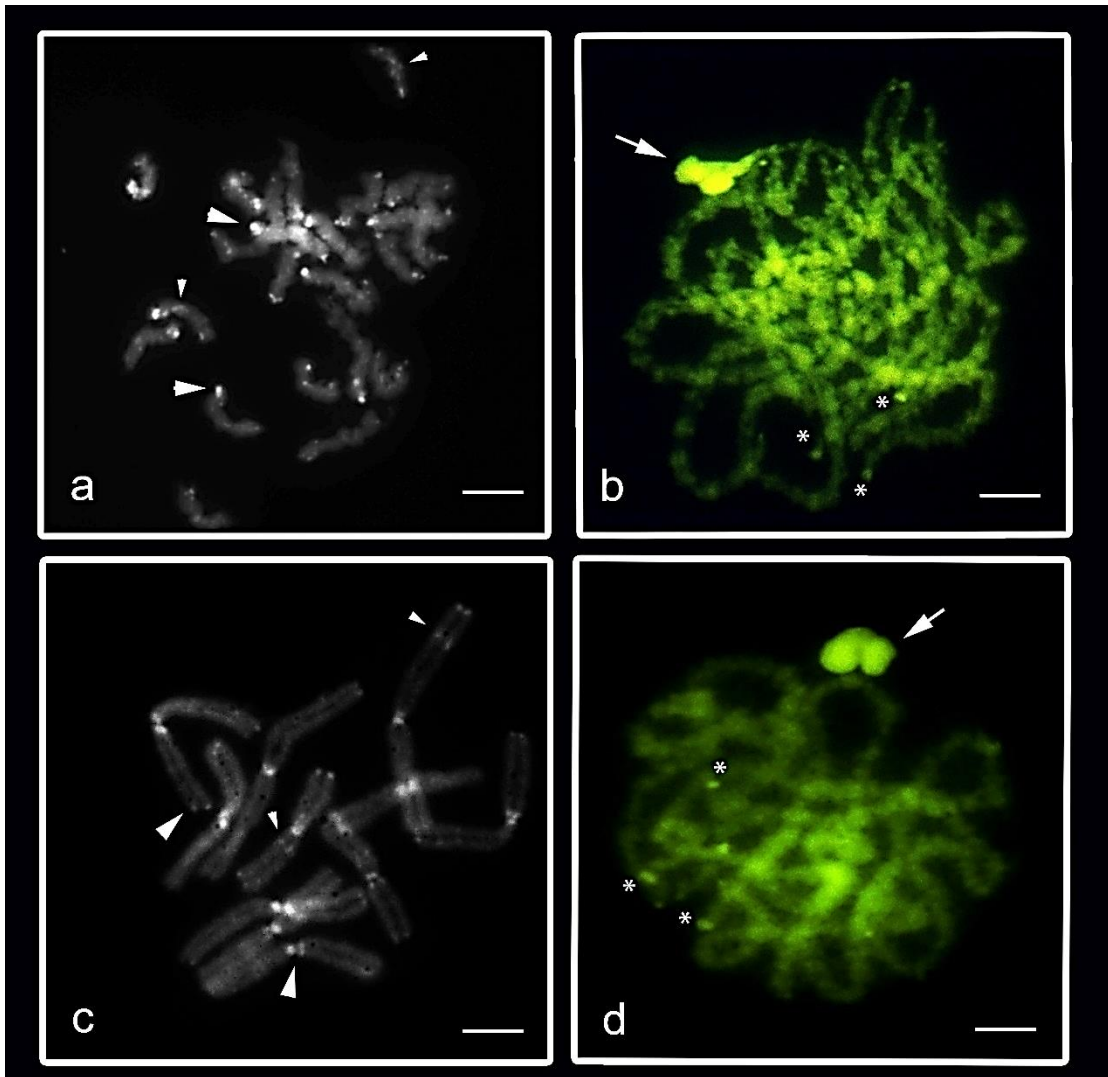
Espécies	Amostras		Local de Coleta
	♂	♀	
<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	22	1	PEMG – Londrina, PR (23°26'22.92"S 51°14'26.66"O)
<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	5	3	PNI – Foz do Iguaçu, PR (25°35'17.48"S 54°28'22.09"O)
<i>Trochosa</i> sp. C. L. Koch, 1847	6	0	RBP – Tuneiras do Oeste, PR (23°51'30.79"S 52°45'31.28"O)



**Figura 1** – Cariótipos de machos de *Trochosa* sp. corados com Giemsa. **a** *Trochosa* sp. (PNI),  $2n_{\text{♂}}=22$ ,  $X_1X_20$ . **b** *Trochosa* sp. (PEMG/RBP),  $2n_{\text{♂}}=11$ ,  $X0$ . Barra=  $10\mu\text{m}$



**Figura 2** – Células meióticas de machos de *Trochosa* sp. coradas com Giemsa. **a-d** *Trochosa* sp. (PNI); **e-h** *Trochosa* sp. (PEMG/RBP). Células em paquíteno (**a,e**) evidenciando os cromossomos sexuais heteroploidicos positivos. Células em diplóteno (**b,f**) evidenciando os univalentes sexuais e a ocorrência de quismas nos bivalentes autossômicos. Células em metáfase I e diacinese (**c, g**) respectivamente, comprovando o número cromossômico em cada indivíduo e seus cromossomos sexuais: (**c**) *Trochosa* sp. (PNI) com 10 bivalentes autossômicos +  $X_1X_2$ 0 dispostos lado a lado e (**g**) *Trochosa* sp. (PEMG/RBP) com 5 bivalentes autossômicos +  $X_0$  como um univalente isolado. Células em anáfase II (**d, h**) mostram a migração conjunta dos cromossomos sexuais, podendo observar células com 12 e 10 cromossomos (**d**) e células com 6 e 5 cromossomos (**h**). As cabeças de seta indicam a célula com maior número de cromossomos Barra= 10 $\mu$ m



**Figura 3** – Meiócito de macho de *Trochosa* sp. submetidas a técnica de bandamento C (**a,c**) e coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (**b,d**). As setas indicam os cromossomos sexuais e as cabeças de seta maiores evidenciam marcações pericentromérica e terminal, e as cabeças de setas menores mostram marcações intersticiais. Em (**a**) metáfase mitótica e (**b**) paquíteno de *Trochosa* sp. (PNI): (**a**) marcações heterocromáticas pericentroméricas em todos os cromossomos, e terminais e intersticiais em alguns cromossomos. Em (**b**) podem ser evidenciadas algumas marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (asterisco). Em (**c**) metáfase mitótica e (**d**) paquíteno de *Trochosa* sp. (PEMG/RBP): (**c**) marcações heterocromáticas terminais, intersticiais e pericentroméricas em alguns cromossomos. Em (**d**) marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (asterisco). Barra = 10μm

## 5. Considerações Finais

O presente estudo trouxe dados inéditos para os gêneros de Lycosidae analisados, com dados de DNA ribossomal nas espécies de *Lycosa* e duas novas descrições citogenéticas para diferentes populações de *Trochosa* sp.

- As espécies de *Lycosa* mostraram  $2n$  equivalente ao já descrito na literatura: *Lycosa erythrognatha* e *L. sericovittata* apresentaram um  $2n♂ = 22$  e um SCS  $X_1X_20$  muito comum dentro da família e *L. nordenskjoldi* um  $2n♂ = 19$  e SCS  $X0$ , considerado raro entre as aranhas.
- *L. erythrognatha* e *L. sericovittata* mostraram heterocromatina localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos, e ricas em pares de base GC, assim como já observado nas espécies de Lycosidae. Um único indivíduo de *L. sericovittata* apresentou marcação terminal em um par cromossômico que se mostrou  $CMA_3^+$ .
- *L. nordenskjoldi* foi a espécie com maior variação na distribuição da heterocromatina, localizada em regiões pericentromérica, intersticial e terminal. Apesar disso, sequências GC ricas só foram detectadas na região pericentromérica.
- A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), com sondas DNAr 18S, mostrou dois pares com RONS terminais em *L. erythrognatha* e *L. sericovittata*.
- *L. nordenskjoldi* apresentou maior variabilidade de sítios de DNAr 18S, entre 2 a 4 pares portadores do gene, com diferenças inter e intrapopulacionais, sugerindo uma evolução cariotípica diferenciada entre os cariótipos, marcada provavelmente por eventos de dispersão de DNA repetitivo.
- Em *L. erythrognatha* a FISH com sonda de Histona H3 mostrou somente um par portador do sítio, na região pericentromérica dos cromossomos, coincidindo com a heterocromatina, o que pode sugerir uma evolução conjunta dessas sequências.
- Um esquema evolutivo foi proposto, a partir dos dados de número diploide e SCS em *Lycosa*, sendo observada uma hipótese evolutiva

com possíveis eventos de rearranjos cromossômicos responsáveis pelos diferentes conjuntos cariotípicos.

- Dois novos conjuntos cariotípicos foram observados nos indivíduos e populações de *Trochosa*: *Trochosa* sp PNI com 22 cromossomos acrocêntricos e um SCS  $X_1X_20$ ; e *Trochosa* PEMG/RBP com 11 cromossomos metacêntricos e SCS  $X0$ , os quais podem ter se originado do cariótipo anterior, provavelmente, por translocações Robertsonianas.
- O número diploide igual a 11, da *Trochosa* sp PEMG/RBP, é o menor já encontrado em Lycosidae, e a morfologia metacêntrica dos cromossomos é o primeiro relato na família.
- A distribuição de heterocromatina nos indivíduos de *Trochosa* difere do padrão da família, apresentando distribuição mais dispersa, semelhante ao observado em *L. nordenskjoldi*. Entretanto, sua constituição não mostrou concentração de regiões GC ricas.