



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MATHEUS PIRES RINCÃO

**“ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CINCO ESPÉCIES DA  
FAMÍLIA CTENIDAE (ARANEAE)”**

---

Londrina  
2016



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

MATHEUS PIRES RINCÃO

**“ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CINCO ESPÉCIES DA  
FAMÍLIA CTENIDAE (ARANEAE)”**

---

Londrina  
2016

MATHEUS PIRES RINCÃO

**“ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CINCO ESPÉCIES DA  
FAMÍLIA CTENIDAE (ARANEAE)”**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Dias

Londrina  
2016



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

Rincão, Matheus Pires.

Análise Citogenética em Cinco Espécies da Família Ctenidae (Araneae) / Matheus Pires Rincão. - Londrina, 2016.  
44 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, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Hibridização Fluorescente in situ - Teses. 2. Entelegynae - Teses. 3. DNAr 18S - Teses. 4. Fluorocromos - Teses. I. Dias, Ana Lúcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.



MATHEUS PIRES RINCÃO

**“ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CINCO ESPÉCIES DA FAMÍLIA  
CTENIDAE (ARANEAE)”**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

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

Londrina, 21 de Março de 2016



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

Richard Milhous Nixon



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial, por sempre iluminar meus passos e me conceder a saúde e a força necessária para concluir mais esta etapa, e por me conduzir em segurança durante as coletas.

Agradeço à Capes, pelo apoio financeiro, sem o qual esta etapa da minha vida não seria possível, à Universidade Estadual de Londrina pelo espaço físico cedido para a realização dos experimentos e atividades, e ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de orgulhosamente ter sido um de seus Mestrandos.

Agradeço ao meu pai, **Vilson Crispo Rincão** e a minha mãe, **Clair de Fátima Pires Rincão**, por serem meus exemplos de esforço e comprometimento.

Agradeço aos meus irmãos, **Vinicius** e **Michelle**, que ingressaram na biologia muito antes de mim, pelos conselhos a respeito da profissão.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por todo aprendizado e apoio que me deram desde o momento em que eu ingressei no **Laboratório de Citogenética Animal: Juceli, Fábio, Mariana, Angélica Rossotti, Natalia, Ana Beatriz, Angélica (Téia), Tatiane, Larissa, Raquel Bozini, Rachel, Laura e Poliana.**

Agradeço às professoras **Lucia Giuliano Caetano, Renata da Rosa, Alberto Fenocchio e Ana Claudia Swarça** por todo apoio, conhecimento e conselhos sobre a citogenética.

Agradeço ao **Rafael** e ao **Mailson** que sempre foram companhia nas viagens para Foz, e ao **Robson** por ter me acompanhado nas noites de coleta em Foz do Iguaçu.

Agradeço ao **João Lucas Chavari**, por me ensinar a coletar e manusear as aranhas e por ajudar durante estes dois anos. E ao professor **Antônio Domingos Brescovit** por seus conhecimentos sobre a morfologia desses animais, por receber no Instituto Butantan e por ajudar na identificação dos animais coletados.

Agradeço à minha namorada **Talita de Souza Menoia**, por estar sempre do meu lado nesses dois anos de Mestrado, me apoiando e fazendo meus dias mais leves e alegres.



Agradeço em especial à minha orientadora, **Ana Lúcia Dias**, que me recebeu no laboratório em 2011 e vem me transmitindo, nesses seis anos, muito apoio, conhecimento, ética, respeito, comprometimento e amizade. Graças a ela que tenho aprendido muito sobre a citogenética e sobre o que é fazer ciência e nela me inspiro para ser o profissional que quero ser um dia.



## RESUMO

1 As aranhas da família Ctenidae são predadoras de artrópodes, anfíbios, peixes e outras espécies de aranhas.  
2 São abundantes nos ambientes florestais do Brasil e possuem algumas espécies de importância médica,  
3 como as aranhas do gênero *Phoneutria*, que são consideradas algumas das aranhas mais perigosas do  
4 mundo. A principal característica que distingue Ctenidae, das demais famílias de aranhas, é o padrão de  
5 disposição dos olhos, do tipo 2-4-2. A ordem Araneae possui mais de 45 mil espécies, contudo, a família  
6 Ctenidae possui apenas 503 espécies descritas, divididas em 5 subfamílias (Acantheinae, Acanthotheninae,  
7 Calocteninae, Cteninnae e Viridasiinae) e 41 gêneros. Das quais oito espécies, incluindo três das cinco  
8 famílias, foram cariotipadas até o momento. A filogenia da família Ctenidae é controversa para diversos  
9 gêneros, principalmente *Ctenus*, considerado por diversos autores como sendo polifilético. A melhor  
10 maneira de se conhecer as relações evolutivas entre as espécies é uma análise integrada entre diferentes  
11 linhas de conhecimento, e a citogenética é uma forte ferramenta para investigar o caminho carioevolutivo  
12 percorrido pelas espécies. No presente estudo foram analisadas cinco espécies (*Ctenus ornatus*, *Ctenus*  
13 *medius*, *Phoneutria nigriventer*, *Viracucha andicola* e *Enoploctenus cyclothorax*), coletadas em quatro  
14 diferentes localidades, nos estados do Paraná e São Paulo, Brasil. Foram feitas análises mitóticas, para se  
15 estabelecer o número diplóide das espécies, e análises meióticas, a fim de conhecer o comportamento dos  
16 cromossomos durante a formação dos gametas. Foi observado um  $2n=28$  ( $26+X_1X_20$ ) para os machos de  
17 todas as espécies, exceto *V. andicola* que apresentou um  $2n=29$  ( $26+X_1X_2X_30$ ), nos machos. As análises  
18 meióticas permitiram observar que os cromossomos sexuais se mantiveram heteropnóticos positivos, em  
19 relação aos autossomos, durante o início da primeira divisão meiótica, e mostraram um comportamento de  
20 associação em paralelo, provavelmente auxiliando na correta segregação desses cromossomos durante a  
21 divisão celular, em machos. O bandamento-C corado com fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI  
22 revelou heterocromatina pericentromérica GC rica (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) em todas as espécies, porém *C. ornatus*  
23 apresentou também bandas intersticiais, e na população de Ubatuba-SP houve um acúmulo de  
24 heterocromatina GC rica em um dos bivalentes. A FISH permitiu identificar que esse bivalente  
25 correspondia ao par cromossômico portador dos sítios de DNAr 18S. Todas as espécies analisadas  
26 apresentaram um bivalente portador de sítios de DNAr 18S, exceto *P. nigriventer*, que apresentou três  
27 bivalentes portadores, embora em um desses bivalentes apenas um dos homólogos se mostrou portador do  
28 sítio. *Viracucha andicola* deste estudo mostrou diferenças no número de RONS, em relação aos dados  
29 descritos na literatura, que apresentou um padrão múltiplo de AgRONS, indicando que pode estar  
30 ocorrendo uma divergência interpopulacional, que se justifica levando em conta o bioma extremamente  
31 fragmentado em que a espécie se encontra, associado com o isolamento geográfico entre as populações. O  
32 presente estudo trouxe também pela primeira vez a descrição cariotípica para duas espécies, *Ctenus medius*  
33 e *Enoploctenus cyclothorax*, sendo esta última o primeiro registro para a subfamília, Acantheinae,  
34 fornecendo importantes contribuições para o conhecimento cariotípico da Ctenidae.

35 **Palavras-chaves:** Acantheinae. Citogenética de aranhas. DNAr 18S. *Ctenus*. Heterocromatina.  
36 *Phoneutria*

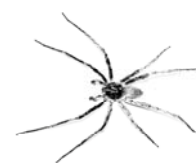


RINCÃO, Matheus Pires. **Cytogenetic analysis of 5 species of Ctenidae (Aranae)**. 2016. 44 p Dissertation (Master's in Genetics and Molecular Biologia Molecular)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

1 The Ctenidae spiders are predatory of arthropods, amphibians, fish and other species of spiders.  
2 They are abundant in forest environments in Brazil and have some species of medical importance,  
3 such as *Phoneutria* genus, which are considered some of the most dangerous spiders in the world.  
4 The main feature that distinguishes Ctenidae, to the other families, is the standard arrangement of  
5 eyes, of the type 2-4-2. The order Araneae has more than 45,000 species, however, the Ctenidae  
6 family has only 503 described species, divided into five subfamilies (Acantheinae, Acanthocteninae,  
7 Calocteninae, Cteninnae and Viridasiinae) and 41 genera. Of which eight species, including three  
8 subfamilies, were karyotyped so far, accounting for 3 of the 5 subfamilies. The phylogeny of  
9 Ctenidae family is controversial in many genera, especially in *Ctenus* genus, considered by many  
10 authors as polyphyletic. The best way to understand the evolutionary relationships between species  
11 is an integrated analysis of different lines of knowledge, and cytogenetics is a powerful tool for  
12 investigating the karyotype evolution of the species. Five species were analyzed (*Ctenus ornatus*,  
13 *Ctenus medius*, *Phoneutria nigriventer*, *Viracucha andicola* and *Enoploctenus cyclothorax*),  
14 collected at four different locations, on São Paulo and Paraná Brazilian's states. The mitotic  
15 analyses were made to establish the diploid number of species, and meiotic analysis in order to  
16 understand the behavior of chromosomes during the formation of gametes. The  $2n = 28$  ( $26 +$   
17  $X1X20$ ) was observed for all species except *V. andicola* which showed a  $2n = 29$  ( $26 + X1X2X30$ ).  
18 The meiotic analysis allowed the observation that the sex chromosomes remained positive  
19 heteropycnotic in relation to autosomes, during the beginning of the first meiotic division, and  
20 showed a parallel association behavior, probably assisting in the correct segregation of these  
21 chromosomes during cell division, in males. The banding-C followed by staining with base-specific  
22 fluorochromes (DAPI/CMA<sub>3</sub>) revealed heterochromatin pericentromeric rich GC (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) in all  
23 species, but *C. ornatus* also showed interstitial bands, and in the population of Ubatuba-SP there  
24 was an accumulation of heterochromatin rich GC in one of the bivalent. FISH allowed identifying  
25 that this bivalent corresponded to chromosome pair bearer of sites of 18S rDNA. Additionally, all  
26 species showed one bivalent with 18S rDNA sites, except *P. nigriventer*, who presented three  
27 bivalent carriers, although in one of these bivalent just one of homologous with ribosomal sites.  
28 *Viracucha andicola* this study showed differences in the number of NORs, in relation to data  
29 described in the literature, which showed a multiple pattern of AgRONS, indicating that there may  
30 be an interpopulation divergence, probably associated to the extremely fragmented biome where the  
31 species habit, associated to geographical isolation. This study also brought the first karyotype  
32 description for two species, *Ctenus medius* and *Enoploctenus cyclothorax*, and another subfamily,  
33 Acantheinae, providing an important contribution to the knowledge of the cytogenetic Ctenidae.

34 **Key-words:** Cytogenetic of de spiders. *Ctenus*. Heterochromatin. *Phoneutria*. rDNA 18S.



## LISTA DE TABELAS

### Materiais e Métodos

**Tabela 1.** Espécies analisadas e locais de coleta, Brasil. PR = Estado do Paraná; SP = Estado de São Paulo ..... 09

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Dados citogenéticos em espécies da família Ctenidae, atualizados a partir de Araujo et al. (2014), incluindo dados do presente estudo. NOR = região organizadora de nucléolo; PR = estado do Paraná ; SP = estado de São Paulo..... 32

**Tabela 2.** Espécies analisadas e locais de coleta, Brasil. PR = Paraná; SP = São Paulo. ♂ = machos ..... 33

**Tabela3.** Dados de região organizadora de nucléolos (RONS) identificada por impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) e por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) em diferentes espécies de aranhas..... 34



## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

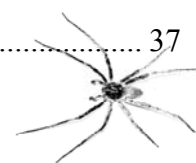
- Figura 1.** Esquema da anatomia interna de uma aranha, montado a partir das imagens de Foelix 2011 ..... 4
- Figura 2.** Esquema do padrão ocular de Ctenidae, 2-4-2..... 6

### Material e Métodos

- Figura 3.** Mapa do Brasil indicando os locais de coleta dos espécimes: **a** Foz do Iguaçu-Paraná; **b** Céu Azul-Paraná; **c** Londrina-Paraná; **d** Ubatuba-São Paulo..... 10
- Figura 4.** Fotos de indivíduos machos das espécies analisadas no presente estudo. **a** *Ctenus medius*; **b** *Ctenus ornatus*; **c** *Phoneutria nigriventer*; **d** *Viracucha andicola*; **e** *Enoploctenus cyclothorax* ..... 11

### Capítulo 1

- Figura 1.** Mapa do Brasil indicando os locais de coleta dos espécimes: **a** Foz do Iguaçu-Paraná; **b** Céu Azul-Paraná; **c** Londrina-Paraná; **d** Ubatuba-São Paulo..... 35
- Figura 2.** Cariótipo de metáfases mitóticas de células espermatogoniais. **A** *Ctenus ornatus*; **b** *Ctenus medius*; **c** *Phoneutria nigriventer*; **d** *Viracucha andicola*. Barra = 10  $\mu$ m ..... 36
- Figura 3.** Células meióticas coradas com Giemsa. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. **a-c** *Ctenus medius*; **d-f** *Ctenus ornatus*; **g-i** *Phoneutria nigriventer*; **j-l** *Viracucha andicola*; **o** *Ctenus medius*; **m-o** *Enoploctenus cyclothorax*. Os paquítenos (**a, d, g, j, m**) evidenciam os cromossomos sexuais heteropicnóticos positivos. As células em diplóteno (**b, e, h, k, n**) mostram os cromossomos sexuais pareados em paralelo (cabeças de seta) e a presença de bivalentes com um (**b**) (setas pretas) ou dois (**e**) quiasmas (setas brancas). As células em diacinese comprovam o número de bivalentes e cromossomos sexuais: *C. medius* (**c**), *C. ornatus* (**f**), *P. nigriventer* (**i**) e *E. cyclothorax* (**o**) com 13 bivalentes +  $X_1X_2$  e *V. andicola* (**l**) com 13 bivalentes +  $X_1X_2X_3$ , em (**f, i, o**) cromossomos sexuais pareados em paralelo e em (**c, l**) aparecem isolados entre si. Em Barra = 10  $\mu$ m ..... 37



- Figura 4.** Células meióticas e mitóticas submetidas ao bandamento-C coradas com fluorocromo base-específico CMA<sub>3</sub>. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. **a** metáfase mitótica de *Ctenus ornatus*, mostrando 28 cromossomos, as setas apontam bandas intersticiais; **b** diacinese de *Ctenus ornatus*, da população de Ubatuba, a seta aponta o bivalente com acúmulo de heterocromatina GC rica; **c** diacinese de *Ctenus medius*, **d** metáfase mitótica de *Phoneutria nigriventer*; **e** diacinese de *Viracucha andicola*, as três espécies com blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pericentroméricos em todos os cromossomos; **f** diacinese de *Enoploctenus cyclothorax*, com pouca heterocromatina pericentromérica: as setas apontam regiões heterocromáticas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Barra = 10 µm ..... 38
- Figura 5.** Células meióticas submetidas à hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. **(a)** diacinese de *Ctenus ornatus*, no detalhe o heteromorfismo de tamanho dos sítios de DNAr 18S entre os homólogos; **(b)** diacinese de *Ctenus medius*; **(c)** diacinese de *Phoneutria nigriventer*; **(d)** diplóteno de *Viracucha andicola*; **(e)** diplóteno de *Enoploctenus cyclothorax*. Barra = 10 µm ..... 39
- Figura 6.** Células de *Ctenus ornatus*. **a** Londrina, PR; **b-c** Ubatuba, SP. **(a)** cariótipo da FISH de metáfase mitótica, mostrando o par cromossômico 10 portador dos sítios de DNAr 18S; **(b)** células em metáfase II com sobreposição de DAPI/CMA<sub>3</sub>, evidenciando os cromossomos que possuem o acúmulo de heterocromatina GC rica (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>); **(c)** sobreposição de DAPI/FISH, FISH sequencial na mesma células em metáfase II, mostrando que os sítios de acúmulo de heterocromatina GC rica correspondem aos sítios de DNAr 18S ..... 40



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS ARANHAS.....	4
2.2	ASPECTOS TAXONÔMICOS E CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CTENIDAE .....	5
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	8
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
4.1	MATERIAIS.....	9
4.2	MÉTODOS .....	12
4.2.1	Obtenção de Cromossomos Meióticos .....	12
4.2.2	Montagem das Lâminas .....	12
4.2.3	Coloração Convencional (Giemsa), Montagem dos Cariótipos e Definição do Número Diplóide .....	12
4.2.4	Técnica de Obtenção de Bandas C (Sumner 1972), Com Algumas Modificações.....	12
4.2.4.1	Marcação com fluorocromos base-específicos .....	12
4.2.5	Hibridização Fluorescente In Situ (FISH) .....	13
4.2.5.1	Obtenção das sondas de DNAr 18S.....	14
4.2.6	Observação das Lâminas.....	14
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>15</b>
	<b>ARTIGO: CROMOSSOMOS SEXUAIS, HETEROCROMATINA E DISTRIBUIÇÃO DOS SÍTIOS DE DNAR 18S EM CINCO ESPÉCIES DA FAMÍLIA CTENIDAE (ARANEAE)</b> .....	<b>19</b>
	<b>Resumo</b> .....	<b>20</b>
	<b>Introdução</b> .....	<b>22</b>
	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>23</b>
	<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>
	<b>Discussão</b> .....	<b>26</b>
	<b>Anexos</b> .....	<b>32</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>41</b>
	<b>Considerações Finais</b> .....	<b>44</b>

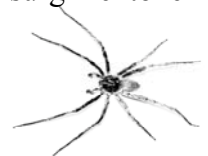


## 1 1 INTRODUÇÃO

2 A ordem Araneae é a segunda maior ordem dos aracnídeos, com espécies distribuídas  
3 por todas as regiões do planeta, exceto na Antártida. Possuem também grande variação em  
4 morfologia, tamanho e preferências alimentares, além de apresentarem comportamentos  
5 complexos de caça e reprodução (Foelix 2011). Assim, sua função ecológica e sua interação  
6 com o ser humano ressaltam a importância em estudar estes organismos. Com espécies, em  
7 sua maioria, restritas aos ambientes florestais, as aranhas Ctenidae são potenciais modelos  
8 para estudos biogeográficos e de mecanismos evolutivos como a deriva genética, uma vez que  
9 estes ambientes estão extremamente degradados e fragmentados no Brasil, ainda mais no que  
10 se refere à Mata Atlântica (Ribeiro et al. 2009).

11 Nos últimos quinze anos, mais de 8.500 novas espécies de aranhas foram descritas  
12 (Platinick 2001; World Spider Catalog 2016) mesmo assim, há muito por se conhecer sobre  
13 este grupo, considerando que muitos dos ecossistemas tropicais que possuem um alto índice  
14 de endemismo (Carnaval et al. 2009), ainda não foram bem explorados. O baixo número de  
15 estudos sobre estes organismos tem deixado lacunas no conhecimento tanto taxonômico  
16 quanto biogeográfico e genético a cerca desses animais. Essas lacunas dificultam o  
17 estabelecimento de relações evolutivas mais concisas entre as espécies, de modo que análises  
18 integradas entre diversas linhas de conhecimento representam o melhor caminho para  
19 estabelecer hipóteses mais seguras sobre tais relações (Funk e Omland 2003; Nylander et al.  
20 2004).

21 Com mais de 130 anos de estudos citogenéticos em aranhas, desde Carnoy (1885),  
22 muitas espécies foram analisadas. Ainda assim, é uma quantidade muito pequena ao se  
23 comparar com o número de espécies descritas taxonomicamente, havendo mais de 98% as  
24 espécies sem nenhum dado cariotípico (Araujo et al. 2016; World Spider Catalog 2016).  
25 Apesar dessa pequena porcentagem de espécies analisadas, muito se avançou no  
26 conhecimento citogenético das aranhas, principalmente na compreensão do surgimento e



1 evolução dos cromossomos sexuais nesses animais (Král et al. 2006; Král et al. 2007; Araujo  
2 et al. 2012; Korčínková e Král. 2013)

3 A maior parte das análises citogenéticas em aranhas se restringe ao estudo do  
4 comportamento meiótico das espécies e das fases de metáfase mitótica, por meio de coloração  
5 com Giemsa, sendo escassos os estudos que utilizam outras metodologias, como bandamento-  
6 C e G (Rodrigues-Gil et al. 2007), investigação de complexo sinaptonêmico pela microscopia  
7 eletrônica (Král et al. 2007) e impregnação com nitrato de prata, para identificação das  
8 regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), como em Oliveira et al. (2007) . Para a família  
9 Ctenidae, apenas *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877), *Phoneutria nigriventer* (Keyserling,  
10 1891) e *Viracucha andicola* (Simon, 1906) possuem algum dado de AgRONs, sendo que  
11 foram relatadas RONS simples para as duas primeiras espécies e múltiplas para *V. andicola*  
12 com dois pares autossômicos portadores destas regiões (Araujo et al. 2014).

13 A citogenética molecular também é escassa na ordem Araneae, com poucos estudos  
14 empregando fluorocromos base-específicos (Araujo et al. 2005 e 2008), que identificam as  
15 regiões ricas em pares de base AT ou GC, assim como a utilização de hibridização  
16 fluorescente *in situ* (FISH), da qual há dados apenas em quatro trabalhos: Forman et al. (2013)  
17 investigaram os sítios de DNAr 18S em *Wadicosa fidelis* (O. Pickard-Cambridge 1872), na  
18 família Lycosidae; Suzuki e Kubota (2011) estudaram os sítios de DNAr 5S em *Oxyopes*  
19 *sertatus* L. Koch 1878, na família Oxyopidae; genes de produção de proteínas da teia por  
20 Zhao et al. (2010), em *Latrodectus hesperus* Chamberlin e Ivie 1935 e *Latrodectus*  
21 *geometricus* C. L. Koch, 1841, na família Theridiidae e Král et al. (2013) que utilizaram  
22 sondas de DNAr 18S em *Brachypelma albopilosum* Valerio 1980, na família Therophosidae.  
23 Essa técnica abre uma enorme gama de possibilidades na compreensão evolutiva dos  
24 cariótipos, uma vez que trabalha diretamente com a sequências de DNA, analisando sua  
25 distribuição pelo genoma das espécies, como já observado em diversas outras ordens de  
26 artrópodes (Sahara et al. 1999; Watanabe et al. 2010; Cabral-de-Melo 2011).



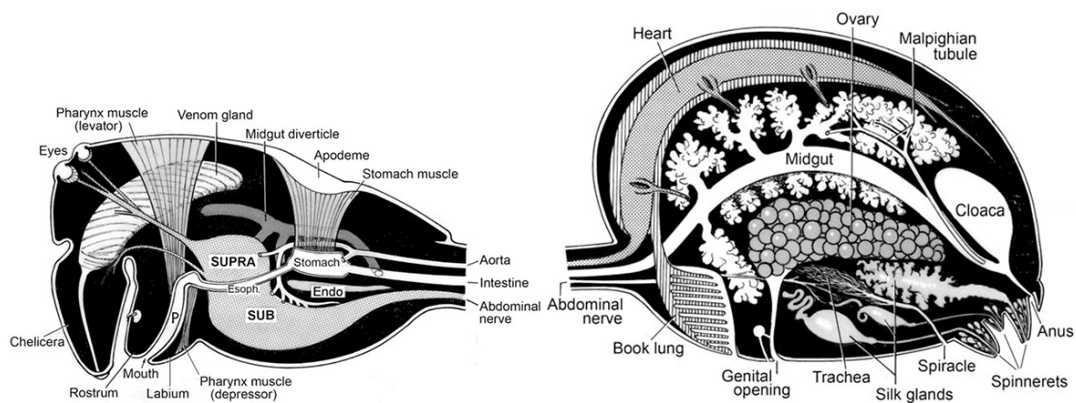
1           Deste modo, a falta de informações citogenéticas dificulta o conhecimento de um  
2 caminho carioevolutivo percorrido pelas espécies de Ctenidae, evidenciando a necessidade do  
3 aumento no número de espécies analisadas citogeneticamente, bem como o emprego de novas  
4 metodologias que possam ser mais resolutivas quanto às características cariotípicas de cada  
5 espécie.



## 1 2 REVISÃO DA LITERATURA

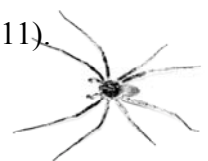
### 2 2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS ARANHAS

3 Atualmente, a ordem Araneae é composta por aproximadamente 46.000 espécies,  
 4 distribuídas em 114 famílias e 3977 gêneros (World Spider Catalog 2016), dispersas por todo  
 5 o planeta e ocupando todos os nichos ecológicos possíveis, exceto o ar e os mares, embora  
 6 algumas espécies utilizem o ar como mecanismo de dispersão, denominado de balonismo. As  
 7 aranhas possuem o corpo dividido em dois segmentos: o prossoma, onde estão localizados os  
 8 olhos, as quelíceras, as glândulas de veneno, o centro do sistema nervoso, as pernas e os  
 9 palpos; e o opistossoma que abriga os órgãos sexuais, a maior porção do sistema digestivo, as  
 10 glândulas de produção de teia e as fiandeiras (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema da anatomia interna de uma aranha, montado a partir das imagens de Foelix 2011.

11 Cinco características corroboram o monofiletismo da ordem Araneae, diferenciando-a  
 12 das demais ordens da classe Arachnida, sendo: fiandeiras no final do opistossoma; assim  
 13 como as glândulas de produção de teia; quelíceras com glândulas de veneno (podendo ser  
 14 reduzidas, modificadas ou ausentes em algumas espécies, como nas famílias Uloboridae e  
 15 Scytodidae, sendo consideradas sinapomorfias nessas famílias, como relatado em revisão por  
 16 Nentwig (2013); palpos modificados para transferência de esperma (nos machos adultos); e  
 17 perda da segmentação abdominal (ao menos de segmentação interna) (Foelix 2011).



1 Os artrópodes, principalmente os insetos, constituem a principal fonte de alimento das  
2 aranhas (Foelix 2011) entretanto, muitos outros animais podem compor parte da sua dieta,  
3 como anfíbios, répteis, aves e pequenos mamíferos (McCormick e Polis 1982; Menin et al.  
4 2005; Barej et al. 2009). Existem ainda espécies que praticam araneofagia, alimentando-se de  
5 outros indivíduos da mesma espécie ou de outras espécies de aranhas (Foelix 2011). Além  
6 disso, diversas famílias possuem registros de herbivoria, sendo que os estudos apontam que  
7 não é comportamento mais frequente do que se acreditava para esse grupo de animais,  
8 embora para a maior parte das espécies estudadas seja uma alimentação alternativa e não  
9 exclusiva, como mostrado na revisão feita em Nentwig (2013).

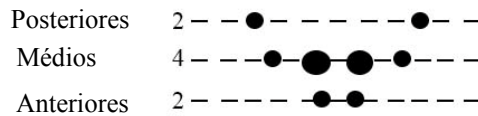
10 As aranhas ganharam mais destaque no cenário mundial por sua importância médica,  
11 com diversos trabalhos investigando a composição química dos venenos e seus possíveis  
12 efeitos (Mendonça et al. 2013; Souza et al. 2012). Dentre as aranhas de interesse médico, duas  
13 famílias se destacam no Brasil, Sicariidae e Ctenidae (Ministério da Saúde 2015). As espécies  
14 do gênero *Phoneutria*, nativas do continente americano e pertencentes à família Ctenidae,  
15 foram responsáveis por 3.453 casos de acidentes com picadas de aranha no Brasil no ano de  
16 2014 (Ministério da Saúde 2015), sendo consideradas como algumas das mais perigosas  
17 espécies de aranhas da América do Sul (Bath 2002).

## 2.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS E CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CTENIDAE

18 Dentre as famílias mais representativas nos trabalhos de ecologia no Brasil está à  
19 família Ctenidae (Raizer et al. 2005; Brescovit et al. 2011; Chavari et al. 2014). As aranhas  
20 desta família são geralmente de médio a grande porte, rápidas e não fazem teia, de hábitos  
21 noturnos, e são conhecidas popularmente como “tropical wolf spiders” (Lucas 1988), sem  
22 possuírem um nome popular que abranja o grupo no Brasil, a não ser as espécies conhecidas  
23 como “armadeiras”, pertencentes ao gênero *Phoneutria*. São muito abundantes no continente  
24 Sul-Americano, mas seus gêneros são dispersos por toda a região tropical do planeta (World  
25 Spider Catalog 2016). A característica mais marcante, que distingue a família, é o arranjo



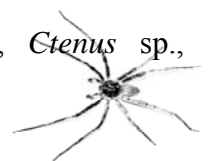
1 ocular, do tipo 2-4-2 (Silva 2003) (**Figura 2**). Além disso, uma importante adaptação é a  
 2 presença da estrutura denominada de “great-shaped tapetum” no interior dos olhos  
 3 secundários, usado para denominar o clado GST, que abriga, entre outras, as espécies da  
 4 superfamília Lycosoidea e que permite a esses animais enxergarem melhor à noite (Griswold  
 5 1993).



6 **Figura 2.** Esquema do padrão ocular de Ctenidae, 2-4-2

7 Ctenidae abriga 503 espécies e 41 gêneros distribuídos, em sua maioria, em cinco  
 8 subfamílias, Acenteninae, Acanthoeteninae, Calocteninae, Cteninae e Viridasiinae, segundo  
 9 Silva (2003), que evidenciou que diversos gêneros da família não são monofiléticos,  
 10 enquadrando ainda algumas espécies no grupo denominado “incertae sedis”, que possui  
 11 espécies cuja posição filogenética ainda é muito duvidosa dentro da superfamília Ctenoidea.  
 12 Polotow e Brescovit (2014) propuseram o polifiletismo da subfamília Cteninae demonstrando  
 13 que dentro do próprio gênero *Ctenus* há diversos clados parafiléticos. O polifiletismo do  
 14 gênero *Ctenus* é consenso entre diversos autores (Simó e Brescovit 2001; Silva 2003; Polotow  
 15 e Brescovit 2009 e Polotow e Brescovit 2014), sendo o maior gênero da família, abrigando  
 16 232 espécies (World Spider Catalog 2016), quase 50% do total de espécies em Ctenidae.

17 Apesar de ser uma família de aranhas abundante no Brasil e de sua importância  
 18 médica, Ctenidae ainda é muito pouco estudada do ponto de vista citogenético, com apenas  
 19 oito espécies, dentre as 503 espécies descritas, com algum dado cariotípico (Araujo et al.  
 20 2016). Das cinco subfamílias aceitas atualmente, apenas três tem alguma espécie cariotipada:  
 21 em Acanthoeteninae foram analisadas as espécies *Nothroctenus* sp. e *Viracucha andicola* com  
 22  $2n=29$ ,  $X_1X_2X_30♂$ ; na subfamília Viridasiinae foi estudada *Asthenoctenus borellii* Simon,  
 23 1987 com  $2n=22$ ,  $X_1X_20♂$ ; e na subfamília Cteninae, *Ctenus ornatus*, *Ctenus* sp.,



1 *Parabatinga brevipes* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria nigriventer*, com  $2n=28$ ,  $X_1X_20♂$ ,  
2 todas analisadas por Araujo et al. (2014) e *Anahita fauna* Karsch, 1879, com  $2n=29$ ,  
3  $X_1X_2X_30♂$ , analisada por Chen (1999).

4 Como descrito acima, a família Ctenidae apresenta um baixo número de espécies  
5 analisadas, com sistemas cromossômicos de determinação sexual (SCDS) variando entre  
6  $X_1X_20$  e  $X_1X_2X_30$ , sem variação congênica, e com uma espécie, *Asthenoctenus borelli*,  
7 diferindo quanto à quantidade de autossomos, com 10 pares autossômicos contra 13 pares nas  
8 demais espécies analisadas da família. Araujo et al. (2014) sugerem que a origem do sistema  
9  $X_1X_2X_30$  em Ctenidae possa ter ocorrido segundo o proposto Bole-Gowda (1952), através de  
10 um cromossomo B, que foi observado em algumas células de *Ctenus ornatus*, uma vez que  
11 este cromossomo extra se comportou de modo similar aos cromossomos sexuais da espécie.

12 Araujo et al. (2014) também definiram, pela técnica de impregnação com nitrato de  
13 prata, o número de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) para três espécies, sendo o par  
14 10 portador para *Ctenus ornatus* e *Phoneutria nigriventer*, e os pares 6 e 10 para *Viracucha*  
15 *andicola*. Nenhuma outra técnica de bandeamento cromossômico foi empregada nas aranhas  
16 dessa família, de modo que os dados citogenéticos ainda são muito incipientes para maiores  
17 inferências sobre relações evolutivas e citotaxonômicas.

18 O avanço nos estudos citogenéticos em Ctenidae permitirá discutir a variabilidade  
19 cariotípica na família, bem como compreender a evolução cromossômica e auxiliar em  
20 estudos filogenéticos e taxonômicos desse grupo de aranhas.



### 1 3 OBJETIVOS

#### 2 3.1 OBJETIVOS GERAIS

3 Investigar citogeneticamente cinco espécies de aranhas da família Ctenidae, em  
4 diferentes populações, a fim de identificar padrões cromossômicos espécie-específicos,  
5 contribuindo para um melhor entendimento das relações evolutivas dentro do grupo. Além de  
6 investigar a distribuição das sequências de DNAr 18S no genoma das espécies analisadas.

#### 7 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

8 Determinar o número diplóide das espécies analisadas e os possíveis sistemas de  
9 determinação cromossômica sexual;

10 Isolar uma sonda de DNAr 18S, a partir do genoma de *Ctenus ornatus*;

11 Localizar e determinar o número de sítios de DNAr 18S, a fim de definir um padrão  
12 para cada uma das espécies;

13 Definir o padrão de distribuição e composição de bandas heterocromáticas através da  
14 coloração com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI.

15 Identificar possíveis marcadores cromossômicos que ajudem na identificação de  
16 espécies da família.



## 1 4 MATERIAIS E MÉTODOS

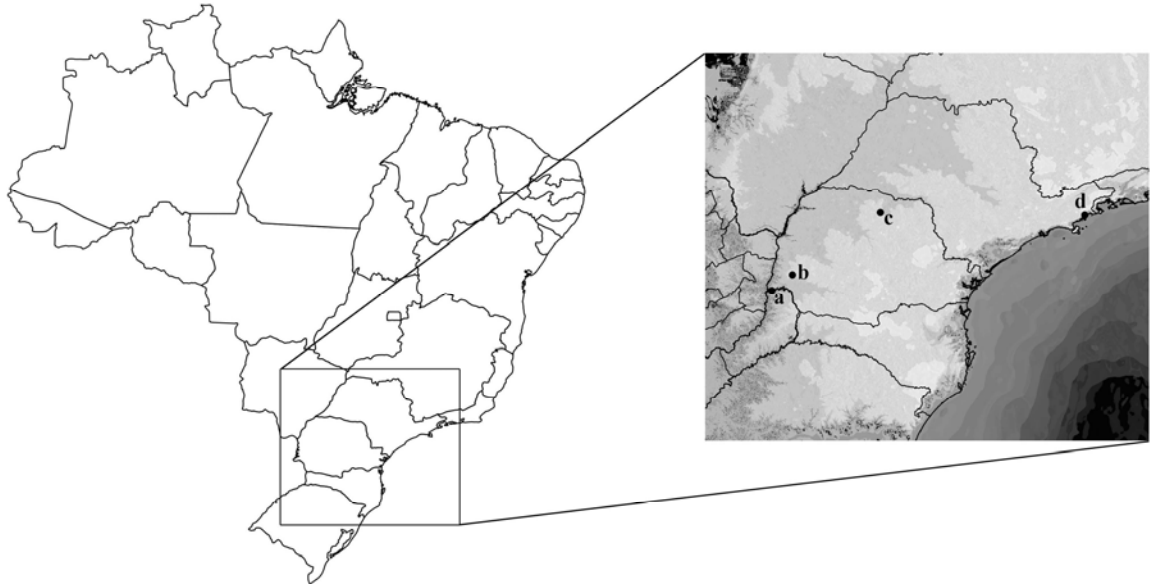
### 2 4.1 MATERIAIS

3 Foram utilizados testículos de aranhas machos, jovens e adultos de cinco espécies da  
 4 família Ctenidae (**Tabela 1**), coletadas no Campus da Universidade Estadual de Londrina,  
 5 Londrina-PR; no Parque Nacional do Iguaçu, em Foz do Iguaçu-PR e Céu Azul-PR e em  
 6 Ubatuba-SP, todos municípios brasileiros (**Figura 3**). Os espécimes foram depositados no  
 7 Laboratório Especial de Coleções Biológicas, do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil,  
 8 com curadoria do Dr Antônio Domingos Brescovit. As espécies (Figura 4) foram identificadas  
 9 por João Lucas Chavari, especialista do mesmo laboratório.

**Tabela 1.** Espécies analisadas e locais de coleta, Brasil. PR = Paraná; SP = São Paulo

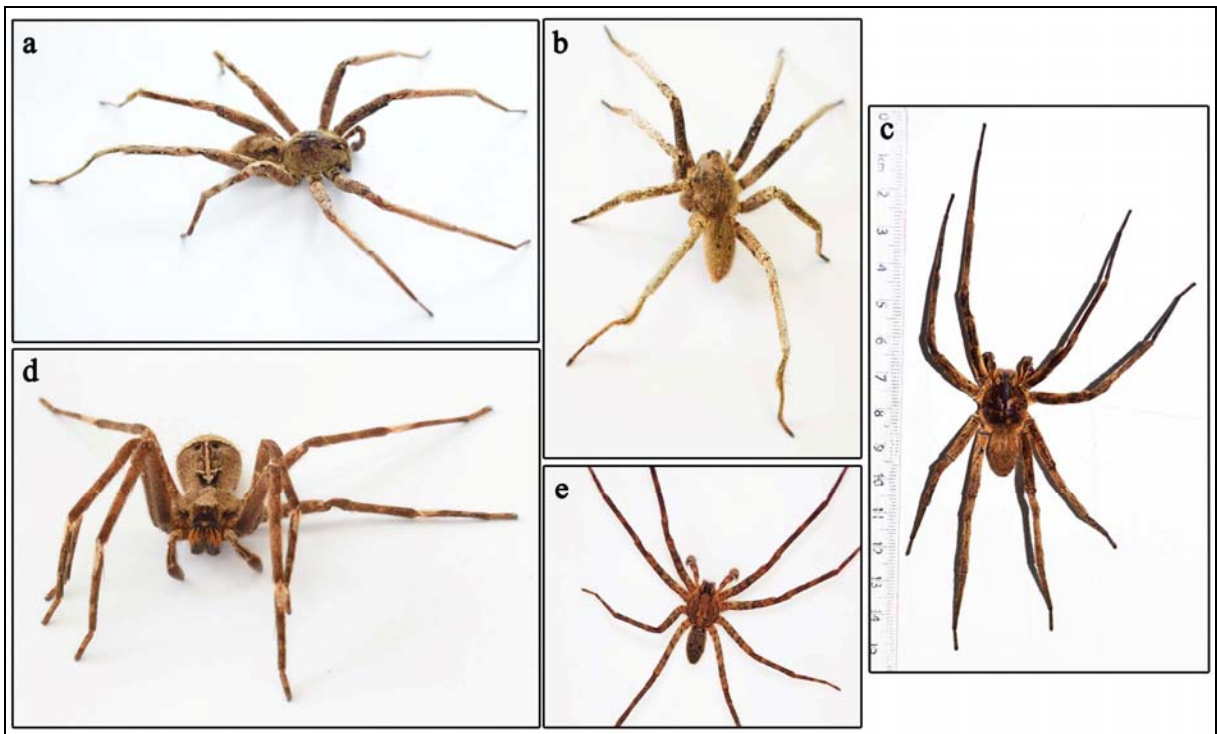
Species	Sample (♂)	Collection Locality
<b>Subfamília Acanthoetninae</b>		
<i>Viracucha andicola</i>	2	Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	5	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
<b>Subfamília Cteninae</b>		
<i>Ctenus ornatus</i>	2	Foz do Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°37'41.2"S 54°27'47.2"W)
	14	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	11	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
	4	Ubatuba, SP (23°24'14.3"S 45°03'54.0"W)
<i>Ctenus medius</i>	5	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
	1	Foz do Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°37'41.2"S 54°27'47.2"W)
<i>Phoneutria nigriventer</i>	1	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	4	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
	3	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
<b>Subfamília Acantheinae</b>		
<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	3	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)





**Figura 3.** Mapa do Brasil indicando os locais de coleta dos espécimes: **a** Foz do Iguaçu-Paraná; **b** Céu Azul-Paraná; **c** Londrina-Paraná; **d** Ubatuba-São Paulo





1 **Figura 4.** Fotos de indivíduos machos das espécies analisadas no presente estudo. **a** *Ctenus medius*; **b** *Ctenus*  
 2 *ornatus*; **c** *Phoneutria nigriventer*; **d** *Viracucha andicola*; **e** *Enoploctenus cyclothorax*

3



## 1 4.2 MÉTODOS

### 2 4.2.1 Obtenção de Cromossomos Meióticos ( segundo Araujo et al. 2008)

3 Os espécimes foram anestesiados e eutanasiados em freezer -20°C, as gônadas foram  
4 retiradas em solução fisiológica para artrópodes (7,5g de NaCl, 2,38g de Na<sup>2</sup>HPO<sup>4</sup>, 2,72g de  
5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em 1 litro de água destilada). Em seguida, foram transferidas para uma solução de  
6 colchicina a 0,16%, preparada com solução fisiológica, durante 2 horas. Foi adicionado,  
7 então, um volume de água de torneira, para atuar como solução hipotônica, por 15 minutos.  
8 Após, o material foi transferido para um tubo contendo fixador em Carnoy I (metanol-ácido  
9 acético, na proporção de 3:1), durante 60 minutos. E por fim, foi armazenado em fixador  
10 Carnoy I, à -20°C.

11

### 12 4.2.2 Montagem das Lâminas

13 Um fragmento do testículo foi dissociado em uma gota de solução de ácido acético a  
14 60% e, com o auxílio de pinças. Logo após, o material foi pressionado com auxílio de  
15 lamínula de vidro e imerso em nitrogênio líquido. Imediatamente após a imersão, a lamínula  
16 foi retirada e a lâmina deixada para secar ao ar.

17

### 18 4.2.3 Coloração Convencional (Giemsa), Montagem dos Cariótipos e Definição do Número 19 Diplóide

20 Após a montagem, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 3% (47mL de  
21 água destilada, 1,5mL de Giemsa e 1,5mL de tampão fosfato pH 6.8) durante 10 minutos.  
22 Foram lavadas rapidamente em água de torneira e deixadas ao ar para secar. As medições  
23 cromossômicas para montagem dos cariótipos foram feitas com o auxílio do programa de  
24 computador Micromeasure versão 3.3 (Reevers e Tear 2000) através da medição dos  
25 cromossomos, metáfases mitóticas. O número diplóide foi definido pela análise de 30 células,  
26 mitóticas e meióticas.

27



#### 1 4.2.4 Técnica de Obtenção de Bandas C (Sumner 1972), Com Algumas Modificações

2 As lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico (0.1N), à temperatura  
3 ambiente, por 10 minutos. As lâminas foram então submetidas ao bário octahidratado a 5%,  
4 durante 2 minutos, à temperatura de 60°C. Após, as lâminas foram lavadas sucessivas vezes  
5 em ácido clorídrico (0.1N), a fim de promover a retirada total do bário. Por fim, foram  
6 mantidas em 2xSSC, 60°C, por 60 minutos, lavadas em água e deixadas para secar. As  
7 lâminas foram coradas com 50 µL de Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), por 90 minutos, em seguida,  
8 foram lavadas em água, secas ao ar e coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), por 30  
9 minutos (Schweizer, 1980). As lâminas foram lavadas e montadas com meio de montagem  
10 (glicerol e cloreto de magnésio).

11

#### 12 4.2.5 Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH) (Pinkel et al. 1986, com modificações)

13 As lâminas foram desidratadas em série de etanol e tratadas em Formamida  
14 15%/0,2xSSC pH 7,0, a 42°C por 10 minutos, em seguida desidratadas novamente. Após, foi  
15 realizado tratamento com RNase, com 100 µL de solução de RNase (0,4% RNase/2xSSC)  
16 por 1 hora e incubadas por 30 minutos em solução de Pepsina 0,005% (em 10 mM de HCl),  
17 lavadas em 1xPBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, após a fixação as  
18 lâminas foram lavadas em 2xSSC e 1xPBS, e então, desidratadas em série de etanol e  
19 deixadas para secar ao ar. Foi feita, então, a desnaturação com formamida 70% a 70° C por 4  
20 minutos, seguida de uma nova desidratação em série de etanol. O “mix de hibridação” (7,5 µL  
21 de sonda marcada / 30 µL de formamida 50% / 12 µL de sulfato de dextrano 50% / 10,5 µL  
22 de 20x SSC) foi posto em banho-maria aquecido a 80°C, por 10 minutos, depois imerso em  
23 gelo por 10 minutos. Foram utilizados 50 µL do “mix de hibridação” para cada lâmina, que  
24 foi incubada em câmara úmida à 37°C, *overnight*. As lâminas foram, em seguida, lavadas em  
25 formamida 15%/0,2xSSC aquecida a 42°C por 10 minutos e em 0,1xSSC aquecido a 60°C, e  
26 em 4xSSC/0,5%Tween. A detecção do sinal foi realizada utilizando 50 µL da solução de  
27 detecção (0,25 µL de anti-Digoxigenina / 49,75 µL BSA5%) por 1 hora em câmara úmida a  
28 37°C. Em seguida foram realizadas lavagens em 1xPBD a 45°C, e desidratação em série de  
29 etanol e montadas com 25µL de meio de montagem DABCO + 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM + 1µL  
30 DAPI (2µg/mL) por lâmina. A sonda de DNAr 18S foi marcada com kit Dig-Nick translation  
31 (Invitrogen) e detectadas com anti-digoxigenina-rodamina conjugada.

32



#### 1 4.2.5.1 Obtenção das sondas de DNAr 18S

2 A sonda de DNAr 18S foi extraída e isolada de *Ctenus ornatus* com auxílio de um par  
3 de primers descrito por Forman et al. (2013), clonado com Kit PEGem, obtendo 1 único  
4 clone, e enviado para seqüenciamento em seqüenciador ABI-Prism 3500 GeneticAnalyzer  
5 (AppliedBiosystems); mais um par de primers, desenhado a partir das sequências geradas pelo  
6 primeiro par, foi necessário para seqüenciamento da sequência completa (1280 bases). As  
7 sequências foram submetidas e depositadas no GenBank (KT698160.1). As sequências foram  
8 blastadas e foi encontrado 99% de similaridade com sequências de DNAr 18S de outras  
9 espécies de aranhas, já depositadas no banco de dados.

10

#### 11 4.2.6 Observação das Lâminas

12 As lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência (Leica DM2000),  
13 equipado com câmera digital MoticamPro 282B. As imagens foram capturadas usando o  
14 programa Motic Images Advanced, versão 3.2, e sobrepostas com o Adobe Photoshop CS6.

15



## 5 REFERÊNCIAS

- Araújo D, Cella DM, Brescovit AD. 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 (2005)
- Araujo D. Citogenética de 13 espécies de aranhas haploginas pertencentes às famílias Pholcidae, Sicariidae e Scytodidae (Araneomorphae): evolução cromossômica, sistema cromossômico de determinação sexual e citotaxonomia. Tese de doutorado. Unesp. (2008)
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. Sex Chromosomes and meiosis in spiders: a review. *Meiosis—Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*: 87-108 (2012)
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM. Comparative cytogenetics of seven Ctenidae species (Araneae). *Zoological Science* 31: 83-88 (2014)
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. The spider cytogenetic database. Available in: <[www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase)>. Accessed in: 20/02/2016 (2016)
- Barej MF, Wurstner JAM, Böhme W. Predation on the treefrog *Leptopelis brevirostris* (Anura: Arthroleptidae) by a wandering spider (Araneae: Ctenidae) in Cameroon. *Herpetology Notes* 2: 137-139 (2009)
- Bath FG. A spider's world. Senses and behavior. Berlin (Alemanha). Springer-Verlag. 1: 29-30 (2002)
- Brescovit AD, Oliveira U, Santos AJ. Aranhas (Araneae, Arachnida) do estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. *Biota Neotropica* 11: 717-747 (2011)
- Bole-Gowda BN. Studies on the chromosomes and the sex-determining mechanism in four hunting spiders (Sparassidae). *Proceedings of the Zoological Society of Bengal* 5: 51-70 (1952)
- Cabral-de-Melo D. Cytogenetic Mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 Histone Genes in 4 Ancient Proscopiidae Grasshopper Species: Contribution to Understanding the Evolutionary Dynamics of Multigene Families. *Cytogenetic and Genome Research* 132: 89-93 (2011)
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C. Stability predicts genetic diversity in Brazilian atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789 (2009)
- Carnoy, J. B. La cytodierese chez les arthropodes. *Cellule* 1: 189-440 (1885)
- Chavari JL, Cipola NG, Brescovit AD. Records of Spiders (Arachnida: Araneae) of the Parque Estadual Mata São Francisco, Paraná, Brazil. *Check List* 10: 1435-1444 (2014)#



- Chen SH. Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). *Zoological Studies* 38: 423-434 (1999)
- Foelix RF. *Biology of spiders*. New York. Oxford University Press. 3: 3-48 (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* 141: 43-49 (2013)
- Funk DJ, Omland KE. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol. Evol. Syst.* 34:397-423 (2003)
- Griswold CE. Investigations into the phylogeny of the lycosoid spiders and their kin (Arachnida: Araneae: Lycosoidea). *Smith. Contrib. Zool.* 539: 1–39 (1993)
- Král J, Musilová J, Šťáhlavský F, Řezáč M, Akan Z. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Res* 14: 859–880 (2006)
- Král J. Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. *Chromosome Res* 15: 863–879 (2007)
- Korínková T, Král J. Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders. *Spider Ecophysiology*. 1st Ed. Springer: 159-171 (2013)
- Lucas S. Spiders in Brazil. *Toxicon* 26: 759-772 (1988)
- McCormick S, Polis GA. Arthropods that prey on vertebrates. *Biological Reviews* 57: 29-58 (1982)
- Menin M, Rodrigues DJ, Azevedo CS. Predation on amphibians by spiders (Arachnida, Araneae) in the Neotropical region. *Phyllomedusa* 4: 39-47 (2005)
- Mendonça MCP, Soares ES, Stávale LM, Rapôso C, Coope A, Kalapothakis E, Crus-Höfling MA. Expression of VEGF and Flk-1 and Flit-1 receptors during blood-brain barrier (BBB) impairment following *Phoneutria nigriventer* spider venom exposure. *Toxins* 5:2572-2588 (2013)
- Ministérios da Saúde. SISNAM. Available in: <<http://www.saude.gov.br/sinanweb>>. Accessed in: 10/03/2015 (2015)
- Nentwig H. *Spider Ecophysiology*. Berlin (Alemanha). Springer Verlag (2013)
- Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL. Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Systematic Biology* 53:47-67 (2004)
- Oliveira RM, Jesus AN, Brescovit AD, Cella MD. Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocylus*



- globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Anraneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). *Journal of Arachnology* 35:293-306 (2007)
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938 (1986)
- Platnick NI. The world spider catalog, version 2.0. American Museum of Natural History. Available in: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Accessed in: 15/12/2015 (2001)
- Polotow D, Brescovit AD. Description of *Toca*, a new neotropical spider genus (Araneae, Ctenidae, Calocteninae). *Journal of Arachnology* 37: 243-245 (2009)
- Polotow D, Brescovit AD. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 170: 333-361 (2014)
- Raizer J, Japyassú HF, Indicatti RP, Brescovit AD. Comunidade de aranhas (Arachnida, Araneae) do pantanal norte (Mato Grosso, Brasil) e sua similaridade com a araneofauna amazônica. *Biota Neotropica* 5: 1-16 (2005)
- Reeves A e Tear J. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure> (2000)
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian atlantic forest: how much is left, and how is remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation* 142: 1141-1153 (2009)
- Rodríguez Gil SG, Merani MS, Scioscia CL, Mola LM. Cytogenetic in three species of *Polybetes* Simon 1897 from argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *Journal of Arachnology*, 35:227-237 (2007)
- Sahara K, Merez F, Trout W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* 7: 449-460 (1999)
- Schweizer D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 27:190–193 (1980)
- Silva DD. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 274: 1–86 (2003)
- Simó M, Brescovit AD. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. *Bull. Br. arachnol Soc.* 12: 67-82 (2001)
- Souza AH, Castro-Jr CJ, Rigo KF, Oliveira SM, Gomez RS, Diniz DM, Borges MH, Cordeiro MN, Silva MAR, Ferreira J, Gomez MV. An evolution of antinociceptive effects of  $\text{Ph}\alpha 1\beta$ , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*, and  $\omega$ -Conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol* 33:59-67 (2012)



- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304–306 (1972)
- Suzuki G e Kubota S. 5S ribosomal DNA cluster of a lynx spider *Oxyopes sertatus* includes a hisbtone H2B-like gene in the spacer region (NTS). *Chromosome Science* 14: 3-8 (2011)
- Zaho Y, Ayoub NA, Hayashi CY. Chromosome mapping of dragline silk genes on the genomes of widow spider (Araneae, Theridiidae). *PLoSONE* 5: e12804 (2010)
- Watanabe M, Tsurusaki N, Kubota S. Molecular cytogenetic characterization of 5S ribosomal DNA in the harvestman *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Chromosome Science* 12: 51-53 (2010)
- World Spider Catalog. The world spider catalog, version 17.0. American Museum of Natural History. Available in: <<http://www.wsc.nmbe.ch>>. Accessed in: 09/03/2016 (2016)



**ARTIGO****ANÁLISES CITOGENÉTICAS DE CINCO ESPÉCIES DA FAMÍLIA CTENIDAE  
(ARANEAE): NOVAS CONTRIBUIÇÕES PARA HETEROCROMATINA E  
DISTRIBUIÇÃO DOS SÍTIOS DE DNAR 18S**

Este artigo será submetido à publicação na revista Cytogenetic and Genome Research



## Análises citogenéticas de cinco espécies da família Ctenidae (Araneae): novas contribuições para heterocromatina e distribuição dos sítios de DNAr 18S

Matheus Pires Rincão<sup>1</sup>, João Lucas Chavari<sup>2</sup> e Ana Lúcia Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral. <sup>2</sup>Instituto Butantan, Laboratório Especial de Coleções Biológicas.

### Resumo

1 As aranhas da família Ctenidae são abundantes nos ambientes florestais do Brasil e possuem algumas  
 2 espécies de importância médica, como as aranhas do gênero *Phoneutria*, que são consideradas  
 3 algumas das aranhas mais perigosas do mundo. A família Ctenidae possui 503 espécies descritas,  
 4 divididas em cinco subfamílias e 41 gêneros, porém apenas oito espécies foram cariotipadas até o  
 5 momento. Diante disso o presente estudo teve o objetivo de analisar cinco espécies da família  
 6 Ctenidae (*Ctenus ornatus*, *Ctenus medius*, *Phoneutria nigriventer*, *Viracucha andicola* e *Enoploctenus*  
 7 *cyclothorax*), coletadas em quatro diferentes localidades do Brasil. Foi observado um  $2n=28♂$  ( $26 +$   
 8  $X_1X_20$ ) para todas as espécies, exceto *V. andicola* que apresentou um  $2n=29♂$  ( $26 + X_1X_2X_30$ ). Os  
 9 cromossomos sexuais se mantiveram heteropicnóticos positivos, em relação aos autossomos,  
 10 durante o início da primeira divisão meiótica e mostraram um comportamento de associação em  
 11 paralelo. O bandamento-C seguido da coloração com fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI  
 12 revelou heterocromatina pericentromérica GC rica (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) em todas as espécies porém, *C. ornatus*  
 13 apresentou também bandas intersticiais, e na população de Ubatuba-SP foi observado um acúmulo  
 14 de heterocromatina GC rica em um dos bivalentes. A FISH permitiu identificar que esse bivalente  
 15 corresponde ao par cromossômico portador dos sítios de DNAr 18S. Adicionalmente, todas as  
 16 espécies analisadas apresentaram 1 bivalente portador de sítios de DNAr 18S, exceto *P. nigriventer*,  
 17 que apresentou 3 bivalentes portadores deste sítio ribossomal. O presente estudo trouxe a primeira  
 18 descrição cariotípica para duas espécies, *Ctenus medius* e *Enoploctenus cyclothorax*, e para mais uma  
 19 subfamília, Acantheinae, fornecendo importantes contribuições para o conhecimento cariotípico da  
 20 família Ctenidae, além de ser um dos primeiros estudos com sonda de DNAr 18S em aranhas.

**Palavras-chave:** bandamento cromossômico, citogenética de aranhas, FISH, fluorocromos, meiose,



## 1 **Introdução**

2 O bioma Mata Atlântica é um “hotspot” da biodiversidade (Mayers et al. 1999),  
 3 contudo está extremamente degradado e fragmentado no Brasil, com menos de 17% da área  
 4 original (Ribeiro et al. 2009). Além disso, o tamanho dos fragmentos influencia na  
 5 sobrevivência das espécies que neles habitam (Levinshon et al. 2005). A Mata Atlântica tem  
 6 um alto índice de riqueza de espécies de aranhas e dentre as mais abundantes, estão as  
 7 espécies da família Ctenidae (Dias et al. 2006), a qual pertence ao clado Entelegynae, na  
 8 infraordem Araneomorphae (Ramirez 2014). Esta família abriga 503 espécies (World Spider  
 9 Catalog 2016) e possui aranhas de importância médica, como o gênero *Phoneutria e*, apesar da  
 10 sua importância tanto médica quanto ecológica, reflete o pequeno número de aranhas  
 11 estudadas citogeneticamente, com apenas oito espécies com dados cariotípicos (Araujo et al.  
 12 2014).

13 De acordo com Silva (2003) a família Ctenidae é dividida em oito linhagens, cinco  
 14 delas correspondendo às subfamílias aceitas atualmente, Acanthoeteninae, Viridasiinae,  
 15 Cteninae, Caloeteninae e Acantheinae, sendo que as duas últimas não possuem dados  
 16 citogenéticos (**Tabela 1**), até o presente momento. Na subfamília Acanthoeteninae foram  
 17 estudadas *Viracucha andicola* (Simon 1906) e *Nothroctenus* sp., com  $2n=29$  ( $26 + X_1X_2X_30$ )  
 18 ♂; na subfamília Viridasiinae, *Athenoctenus borelli* Simon 1897 com  $2n=22$  ( $20 + X_1X_20$ ) ♂;  
 19 e na subfamília Cteninae, *Ctenus* sp., *Ctenus ornatus* (Keyserling 1877) e *Parabatinga*  
 20 *brevipes* (Keyserling 1891) todas com  $2n=28$  ( $26 + X_1X_20$ ) ♂ e analisadas por Araujo et al.  
 21 (2014). E *Anahita fauna* Karsch 1879, também da subfamília Cteninae, com  $2n=29$  ( $26 +$   
 22  $X_1X_2X_30$ ) ♂, analisado por Chen (1999).

23 O sistema de cromossomos sexuais é muito diverso nas aranhas, como mostrado por  
 24 Araujo et al. (2012), variando de sistemas simples, como XY/XX ou X0/XX, à sistemas  
 25 múltiplos, podendo ser  $X_nY_n/X_nX_n$  ou  $X_n0/X_nX_n$ . Em Ctenidae foram observados dois SCDS  
 26 diferentes, até o momento. Em Acanthoeteninae foi relatado sistema do tipo  $X_1X_2X_30$  e em

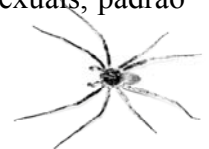


1 Cteninae o sistema do tipo  $X_1X_20$  (Araujo et al. 2014). Estes mesmos autores, observando  
2 células de *Ctenus ornatus*, notaram, em algumas células, a presença de um cromossomo extra  
3 numerário, de comportamento similar aos sexuais. Estes autores sugeriram então, que o  
4 sistema de cromossomos sexuais do tipo  $X_1X_2X_30$  possa ter surgido por um cromossomo  
5 extra-numerário, bem como, que este sistema surgiu diversas vezes na história evolutiva das  
6 aranhas do clado Entelegynae, e que sua conversão no sistema  $X_1X_20$  é um evento recorrente,  
7 e vice-versa.

8         Adicionalmente ao número diplóide e aos cromossomos sexuais, Araujo et al. (2014)  
9 utilizaram a identificação das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), com impregnação  
10 por nitrato de prata, como um importante marcador para caracterizar as espécies e que  
11 permitiu diferir algumas espécies de Ctenidae, como *C. ornatus* e *P. nigriventer* com RONs  
12 simples, terminais no par 10, de *V. andicola*, com RONs terminais nos pares 10 e 6. Mesmo  
13 assim, a impregnação com nitrato de prata não é muito precisa, uma que vez identifica apenas  
14 as RONs ativas antes da divisão celular (Howell e Black 1980) e poder produzir marcações  
15 inespecíficas em regiões heterocromáticas.

16         Dados de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, mais  
17 precisas para identificar o número e localização de RONs, são reportadas apenas, até o  
18 momento, na família Lycosidae por Forman et al. (2013), em *Wadicosa Fidelis* (O. Pickard-  
19 Cambridge 1872) e em em *Brachypelma albopilosum* Valerio 1980, na família Therophosidae  
20 por Král et al. (2013). Outras sondas para FISH em aranhas foram empregadas utilizando  
21 genes de produção de proteínas da teia (Zhao et al. 2010), em *Latrodectus hesperus*  
22 Chamberlin e Ivie 1935 e *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841 (Theridiidae) e DNAr 5S  
23 (Suzuki e Kubota 2011), em *Oxyopes sertatus* L. Koch 1878 (Oxyopidae). Mas os dados para  
24 FISH em aranhas ainda são escassos, se comparados com o número de espécies descritas.

25         O presente estudo teve como objetivo analisar os cromossomos meióticos de cinco  
26 espécies da família Ctenidae, bem como o comportamento dos cromossomos sexuais, padrão

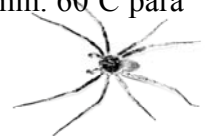


1 de composição e distribuição da heterocromatina, e a localização dos sítios de DNAr 18S,  
 2 para obter informações que possam contribuir para um melhor entendimento da evolução  
 3 cariotípica neste grupo de aranhas.

#### 4 **Materiais e Métodos**

5 Juvenis e adultos de cinco espécies da família Ctenidae, de diferentes locais de coleta,  
 6 foram analisados no presente estudo, como listados na **Tabela 2**. Os espécimes foram  
 7 depositados na coleção aracnológica do Laboratório Especial de Coleções Biológicas,  
 8 Instituto Butantan (IBSP, curador A. D. Brescovit), São Paulo-SP, Brasil. As preparações  
 9 cromossômicas foram obtidas de acordo com Araujo et al. (2008). As lâminas foram coradas  
 10 com solução de Giemsa 3% por 10 min e o número diplóide foi definido pela análise de 30  
 11 células, mitóticas e meióticas. As medições cromossômicas para montagem dos cariótipos  
 12 foram feitas com o auxílio do programa de computador Micromesure versão 3.3 (Reevers e  
 13 Tear 2000). As lâminas foram submetidas ao bandamento-C, de acordo com Sumner (1972), e  
 14 coradas com fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4', 6-diamino2-  
 15 phenylinol (DAPI), de acordo com Schweizer (1980), para determinar a composição da  
 16 heterocromatina.

17 O DNA de *Ctenus ornatus* foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio, em seguida  
 18 foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com o auxílio dos primers forward:  
 19 CGAGCGCTTTTATTAGACCA e reverse GGTTACCTACGGAAACCTT descritos por  
 20 Forman et al. (2013). Outro par de primers foi desenhado no programa Primer3Plus  
 21 (<http://www.bioinformatics.nl>) para permitir o sequenciamento completo do fragmento de  
 22 DNA, forward: TCTGTCTCGTGCGGCTAAAC e reverse:  
 23 GATCCATTGGAGGGCAAGTC. A reação de PCR continha DNA genômico diluído, 1x  
 24 *Taq* buffer, 0,8mM dNTP mix, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol de cada primer e 2.5U de *Taq*  
 25 polymerase (Invitrogen) para uma reação com 25 µl. A amplificação foi feita com uma  
 26 denaturação inicial de 2 min. à 94 °C seguida de 40 ciclos de 1 min. à 94 °C, 1min. 60°C para



1 os primers descritos por Forman et al. (2013) ou 62°C para os primers desenhados para este  
2 estudo e, por fim 5 min à 72 °C. As bandas foram purificadas através da eluição do gel de  
3 agarose, pelo Pure Link-Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). A sequência foi clonada  
4 utilizando o kit pGEM-T Easy Vector System (Promega), em linhagem de *Escherichia coli*  
5 (TOP 10), e o inserto foi sequenciado pelo sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer  
6 (Applied Biosystems).

7 A sequência foi analisada no programa BioEdit, versão 7.2.5 e a relação de  
8 proximidade filogenética com outras sequências de outras espécies de aranhas, já depositadas  
9 no banco de dados (GenBank), foi realizada utilizando o programa MEGA6 (Tamura et al.  
10 2013), sendo que foram utilizadas, para comparação, sequências de DNAr 18S de:  
11 *Heteropoda venatória* (Linnaeus, 1767) (Voucher AB917954.1); Sparassidae sp. (Voucher  
12 JN018249.1), Sparassidae; *Trochosa aquática* Tanaka 1985 (Voucher AB917955.1),  
13 Lycosidae; *Cheiracanthium punctorium* (Villers, 1789) (Voucher JN018248.1), Eutichuridae;  
14 *Tegenaria atrica*, agora *Eratigena atrica* (C. L. Koch 1843) (Voucher JN018250.1),  
15 Agelenidae; *Coelotes terrestris* (Wider 1834) (Voucher AJ007986.1), Agelenidae; *Liphistius*  
16 sp. (Voucher DQ639767.1) e *Liphistius bicoloripes* Ono 1988 (Voucher AF007104.1),  
17 Liphistiidae.

18 Os sítios de DNAr 18S foram identificados pela técnica de hibridização fluorescente *in*  
19 *situ* (FISH), de acordo com Pinkel et al. (1986) e Gouveia et al. (2013), com modificações: no  
20 começo, após a desidratação, as lâminas foram tratadas em formamida 15%/0,2xSSC, tratadas  
21 em Pepsina, e após a hibridização as lâminas foram tratadas novamente em formamida  
22 15%/0,2xSSC. As sondas foram marcadas com o kit Dig-Nick Translation (Invitrogen) e  
23 detectadas com anti-corpo monoclonal antidigoxigenina conjugado com rodamina, e contra-  
24 coradas com DAPI.



1 Finalmente, as lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência (Leica  
2 DM 2000), equipado com câmera digital Moticam Pro 282B, e as imagens foram capturadas  
3 com o software Motic Images Advanced, versão 3.2.

#### 4 **Resultados**

5 Os cariótipos mostraram 28 cromossomos para os machos de *Ctenus ornatus* (**Figura**  
6 **2a**), *Ctenus medius* (**Figura 2b**) e *Phoneutria nigriventer* (**Figura 2c**), e 29 cromossomos  
7 para *Viracucha andicola* (**Figura 2d**). Todas as espécies exibiram 13 pares autossômicos,  
8 gradualmente decrescentes em tamanho. *C. ornatus*, *C. medius* e *P. nigriventer* tem um sistema  
9 cromossômico de determinação sexual (SCDS) do tipo  $X_1X_20$  (**Figuras 2a, b, c**), e *V.*  
10 *andicola* tem um SCDS do tipo  $X_1X_2X_30$  nos machos (**Figura 2d**). Os cromossomos  $X_1$  e  $X_2$   
11 foram sugeridos como os maiores e menores cromossomos, respectivamente, e no SCDS do  
12 tipo  $X_1X_2X_30$ , como o maior, um médio e o menor cromossomo, respectivamente. Os  
13 cromossomos sexuais se mostraram isopicnóticos em metáfase mitótica e a partir de diacinese  
14 nas células meióticas (dados não mostrados). Todos os cromossomos mostraram-se  
15 morfologicamente telocêntricos.

16 Apenas para *Enoploctenus cyclothorax* não foi possível montar o cariótipo, devido à  
17 dificuldade em obter metáfases mitóticas. No entanto, nas fases meióticas, é possível observar  
18 que esta espécie possui 13 bivalentes autossômicos (**Figuras 3n, o**) e SCDS do tipo  $X_1X_20$   
19 (**Figuras 3m, n, o**), ou seja,  $2n=28$  ( $26 + X_1X_20$ ) em machos.

20 Também em paquíteno e diplóteno, os cromossomos sexuais apareceram altamente  
21 condensados, heteropicnóticos positivos, e associados em paralelo (**Figuras 3a, b, h, i, n, o**),  
22 isolados uns dos outros (**Figura 3c, e, m**) ou observados como um corpo heteropicnótico  
23 positivo (**Figuras f, l**). Em diacinese os cromossomos sexuais apareceram isopicnóticos em  
24 relação aos autossomos e mantiveram-se associados em paralelo (**Figuras 3g, j, p**) ou, em  
25 algumas células, separados entre si (**Figuras 3c, m**). Em prófase I, a maior parte das células



1 apresentou bivalentes com apenas um quiasma (**Figura b**) ou, menos frequente, com até dois  
2 cromossomos apresentando dois quiasmas (**Figura 3f**).

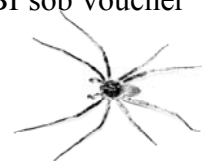
3 As células em metáfase I, observadas em *C. ornatus* evidenciaram a segregação dos  
4 cromossomos sexuais, migrando juntos para o mesmo pólo (dados não mostrados). E em  
5 metáfase II, em *C. medius*, foi possível identificar os cromossomos sexuais, mais  
6 condensados, porém isopicnóticos em relação aos autossomos (dados não mostrados).

7 Em *C. ornatus* as bandas foram  $CMA_3^+$  intersticiais ou terminais em todos os  
8 cromossomos (**Figura 4a**), mas na população de Ubatuba-SP ocorreu um grande bloco,  
9 adicional,  $CMA_3^+$  em um bivalente (**Figura 4b**). Em *C. medius* (**Figura 4c**), *P. nigriventer*  
10 (**Figura 4d**), *V. andicola* (**Figura 4e**) e *Enoploctenus cyclothorax* (**Figura 4f**) todas as  
11 populações apresentaram blocos  $CMA_3^+$ , predominantemente, pericentroméricos.

12 A FISH mostrou apenas um bivalente com sítios de DNAr 18S para *C. ornatus*  
13 (**Figura 5a**), *C. medius* (**Figura 5b**), *V. andicola* (**Figura 5d**) e *E. cyclothorax* (**Figura 5e**).  
14 Adicionalmente, *C. ornatus* exibiu polimorfismo de tamanho nos sítios de DNAr 18S (**Figura**  
15 **5a e 6a**). *P. nigriventer* mostrou 3 bivalentes portadores de DNAr 18S, e um dos bivalentes  
16 apresentou sítios em apenas um dos homólogos (**Figura 5c**).

17 Com a montagem do cariótipo da FISH de *C. ornatus*, foi possível identificar que os  
18 sítios de DNAr 18S estão localizados no par 10 (**Figura 6a**), para a população de Londrina-  
19 PR. Também foi possível identificar que os sítios  $CMA^+$ , com maior acúmulo de  
20 heterocromatina GC rica, em *C. ornatus*, na população de Ubatuba, correspondem aos sítios  
21 portadores do DNAr 18S (**Figura 6b e 6c**).

22 A sequência de DNAr, obtida de *Ctenus ornatus*, foi submetida ao BLASTn no banco  
23 de dados NCBI, para confirmar a homologia com outras sondas de DNAr 18S de aranhas,  
24 apresentando até 99% de homologia com outras sequências de DNAr 18S de aranhas  
25 depositadas no banco de dados (GenBank). A sequência foi depositada no NCBI sob voucher



1 n° KT698160.1. A análise de proximidade filogenética realizada com auxílio do programa  
 2 MEGA6 demonstrou que Ctenidae ocupa uma posição derivada em relação às demais famílias  
 3 comparadas (dados não mostrados).

#### 4 **Discussão**

5 A família Ctenidae, com 503 espécies (World Spider Catalog 2016), possui apenas  
 6 1,6% da suas espécies cariotipadas (Araujo et al. 2016). O presente estudo aumentou esse  
 7 número para 2%, trazendo dados cromossômicos para mais um gênero (*Enoploctenus*) e mais  
 8 duas espécies, *Enoploctenus cyclothorax* e *Ctenus medius*, ainda não descritas.  
 9 Adicionalmente, foram apresentados os primeiros dados de FISH com sonda DNAr 18S para  
 10 a família Ctenidae. O emprego da FISH é importante para compreender não só a evolução  
 11 cariotípica das espécies, mas também o comportamento da sequência de DNAr na família. A  
 12 coloração com Giemsa revelou importantes informações do comportamento dos  
 13 cromossomos, permitindo observar praticamente todas as fases da divisão meiótica e, até  
 14 mesmo, os cromossomos organizados em buquê, comportamento que provavelmente facilita o  
 15 pareamento dos homólogos, como proposto por Niwa et al. (2000).

16 O número diplóide para Ctenidae varia entre as subfamílias como observado por  
 17 Araújo et al. (2014) e no presente estudo (**Tabela 1**), sendo  $2n=29$  ( $26 + X_1X_2X_30$ ) para  
 18 Acanthocteninae,  $2n=22$  ( $20 + X_1X_20$ ) para Viridasiinae,  $2n=28$  ( $26+ X_1X_20$ ) e apenas uma  
 19 espécie com  $2n=29$  ( $26 + X_1X_2X_30$ ) para Cteninae e agora,  $2n=28$  ( $26+ X_1X_20$ ) para  
 20 Acantheinae. O  $2n=28$  é observado em 60% das espécies (Araujo et al. 2016), incluindo os  
 21 dados deste estudo. Noventa por cento das espécies da família exibem 13 pares autossômicos,  
 22 como reforçado pelos dados de *Enoploctenus cyclothorax*, sendo que apenas uma espécie,  
 23 *Asthenoctenus borellii* da subfamília Viridasiinae, apresenta 10 pares autossômicos (Araujo et  
 24 al. 2014). A variação no número diplóide, para as espécies com 13 pares autossômicos,  
 25 consiste na variação do SCDS, sendo que apenas dois tipos de SCDS foram observados em  
 26 Ctenidae,  $X_1X_20$  em 70% das espécies analisadas e  $X_1X_2X_30$  nos outros 30% (**Tabela 1**),

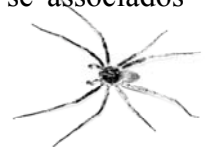


1 considerando que apenas 2% das espécies da família foram estudadas citogeneticamente, até o  
2 presente momento.

3 O SCDS,  $X_1X_2X_30$ , ocorre principalmente nas espécies da subfamília  
4 Acanthoeteninae, considerada basal na filogenia de Ctenidae por Silva (2003) e Polotow e  
5 Brescovit (2014), e em apenas uma espécie da subfamília Cteninae, *Anahita fauna* (Chen  
6 1999), gênero também considerado, por Polotow e Brescovit (2014), como basal nesta  
7 subfamília. Silva (2003) também considerou *Anahita* como basal para a família Ctenidae,  
8 mais próximo assim de Acanthoeteninae do que de Cteninae, e os dados citogenéticos  
9 corroboram com a conclusão da autora. Anteriormente, apenas 3 subfamílias possuíam algum  
10 dado citogenético entretanto, o presente estudo apresentou os dados de *Enoploctenus*  
11 *cyclothorax*, da subfamília Acantheinae, reforçando que  $2n=28$  ( $26 + X_1X_20$ ) é o número  
12 diplóide mais comum dentro da família.

13 Dois aspectos dos cromossomos sexuais foram essenciais para determinar o número  
14 desses cromossomos nas espécies do presente estudo. Primeiro, o número de corpúsculos  
15 heteropicnóticos em prófase I inicial, como reportado por Araujo et al. (2012) e segundo, em  
16 diacinese, pelo número de cromossomos pareados em paralelo (Araújo et al. 2012 e Král et al.  
17 2011), observados na maioria das espécies analisadas, ou isolados como univalentes, mais  
18 observado em *Viracucha andicola*. E apesar de não ter ocorrido análise de fêmeas, as  
19 evidências meióticas associadas ao que já foi descrito em literatura sobre as espécies dessa  
20 família tornou possível determinar os SCDS do tipo  $X_1X_20$  e  $X_1X_2X_30$ .

21 Benavente e Wettstein (1977) estudando a associação destes cromossomos reportaram  
22 a existência de uma estrutura responsável pela associação entre eles, observada em  
23 microscopia eletrônica, denominada de lâmina de junção (LJ) e muito similar ao complexo  
24 sinaptonêmico que, provavelmente, auxilia na segregação dos cromossomos sexuais não-  
25 homólogos, sendo bem aceito por diversos autores (Král et al. 2006, Král et al. 2011 e Araujo  
26 et al. 2012). Nas espécies deste estudo, os cromossomos sexuais mostraram-se associados



1 durante toda a primeira divisão meiótica, provavelmente unidos pela LJ que mantém os  
2 cromossomos sexuais unidos até o final da primeira divisão, entretanto, somente estudos de  
3 microscopia eletrônica podem confirmar a existência dessa estrutura nesses cromossomos.

4 Em algumas células, de todas as espécies, em paquíteno e em diplóteno, os  
5 cromossomos sexuais se mostraram sem associação entre si. Forman et al. (2013) propuseram  
6 que este comportamento em *Wadicosa fidelis* provavelmente seja um artefato de técnica da  
7 preparação cromossômica, causando destruição do pareamento, o que pode também ter  
8 ocorrido com as espécies analisadas no presente estudo.

9 A heterocromatina já foi estudada em diversas famílias de aranhas, contudo poucas  
10 são as espécies onde sua composição foi investigada. Em Scytodiidae, Araujo et al (2008)  
11 encontraram uma predominância de blocos heterocromáticos AT ricos, com algumas  
12 marcações GC ricas intersticiais. Ramalho et al. (2008) e Chemisquy et al. (2008) analisando  
13 espécies de Pholcidae e *Lycosa erythrognatha*, (Lycosidae), respectivamente encontraram  
14 bandas heterocromáticas GC ricas na região pericentromérica de todos os cromossomos,  
15 semelhante ao observado nas espécies aqui analisadas de Ctenidae.

16 Dados de associação de heterocromatina GC com regiões organizadoras de nucléolo  
17 não são raros na citogenética animal como relatado para peixes por Ferro et al. 2001 e para  
18 anfíbios por Schmid (1980). Em aranhas, Araujo et al. (2005) analisando *Nephilingis*  
19 *cruentata*, Nephilidae, observaram marcações GC ricas associadas às RONS. Essa mesma  
20 característica foi observada em nossas análises, principalmente em *Ctenus ornatus*, na  
21 população de Ubatuba-SP, onde houve grande acúmulo de heterocromatina GC rica  
22 colocalizada com os sítios de DNAr 18S.

23 De modo geral, a coloração com fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub>/DAPI  
24 demonstrou ser um importante marcador cromossômico neste grupo de aranhas. Foi possível  
25 identificar diferenças entre a população de *Ctenus ornatus* de Ubatuba e as demais, quanto ao  
26 padrão de distribuição da heterocromatina GC rica, além de elucidar uma expressiva diferença



1 entre *Ctenus medius* e *C. ornatus*, que são espécies muito similares morfologicamente quando  
2 juvenis (comunicação pessoal do Dr. Antônio Domingos Brescovit). Os trabalhos que  
3 descrevem as espécies do gênero *Ctenus* se baseiam exclusivamente nas características dos  
4 órgãos reprodutivos desses animais, que se expressam apenas nos indivíduos adultos  
5 (Brescovit e Simó 2007), não havendo características descritas em literatura que auxiliem na  
6 identificação dos juvenis.

7 O padrão de RONS em aranhas ainda não foi bem estabelecido, uma vez que poucas  
8 espécies, aproximadamente 37 em 18 famílias, foram analisadas a fim investigar a  
9 distribuição dessas regiões no genoma. Os poucos dados para as famílias filogeneticamente  
10 mais próximas à Ctenidae, como Oxyopidae, Lycosidae e Sparassidae (**Tabela 3**), mostram  
11 uma tendência de RONS múltiplas. Contudo, no presente estudo, somente *Phoneutria*  
12 *nigriventer* apresentou sítios múltiplos para o DNAr, sendo que um bivalente portador de  
13 RONS parece ser o mais comumente observado na família Ctenidae (**Tabela 1**). Os dados para  
14 *P. nigriventer* diferem de Araujo et al. (2014), que observaram apenas 1 par portador da RON,  
15 mas utilizaram a impregnação por nitrato de prata, técnica que identifica apenas as RONS  
16 transcricionalmente ativas.

17 Os dados para as populações de *Viracucha. andicola* aqui analisadas também  
18 mostraram divergência com os dados apresentados por Araujo et al. (2014), que observaram  
19 dois pares cromossômicos portadores das RONS, identificados pelo nitrato de prata. É  
20 provável que essas diferenças interpopulacionais tenham se fixado devido ao isolamento  
21 geográfico entre as populações dessa espécie, relacionado ao alto grau de fragmentação do  
22 bioma Mata Atlântica e à pressões evolutivas diferentes. No entanto, Araujo et al. (2014)  
23 analisaram apenas um espécime, de modo que pode não corresponder ao padrão da população  
24 e, além disso, utilizaram o nitrato de prata para localizar essas regiões, podendo este  
25 impregnar em outras regiões do DNA, como heterocromatina.



1 O heteromorfismo de tamanho entre os sítios de DNAr 18S, observado em *Ctenus*  
2 *ornatus*, pode estar relacionado a um crossing over desigual, ocasionando uma duplicação do  
3 sítio de DNAr de um dos homólogos. Situação semelhante pode ter ocorrido em *Phoneutria*  
4 *nigriventer*, onde o crossing over desigual pode ter gerado um sítio de DNAr, em um dos  
5 homólogos excessivamente pequeno, de modo que a FISH não tenha sido eficaz em revelar a  
6 presença desse sítio.

7 A sequência de DNAr 18S apresentou alta similaridade com sequências desse DNAr  
8 de outras espécies de aranhas depositadas no GenBank, demonstrando que esta é uma  
9 sequência conservada neste grupo de animais, reforçando assim sua condição como um  
10 excelente marcador cromossômico para aranhas. A análise de proximidade filogenética com  
11 outras sequências de aranhas corroborou a posição derivada de Ctenidade, mostrando que a  
12 sequência isolada tem uma relação mais próxima com as sequências de Sparassidae e  
13 Lycosidae que de Liphistidae, estando de acordo com as propostas filogenéticas mais recentes  
14 (Ramirez 2014).

O presente estudo consiste em um importante relato para a família Ctenidae contribuindo com novas informações citogenéticas de subfamílias e espécies, além de trazer os primeiros dados de FISH e fluorocromos para esse grupo de aranhas, evidenciando diferenças interpopulacionais e marcadores cromossômicos espécie-específicos.



**Tabela 1.** Dados citogenéticos em espécies da família Ctenidae, atualizados a partir de Araujo et al. (2014), incluindo dados do presente estudo. NOR = região organizadora de nucléolo; PR = estado do Paraná ; SP = estado de São Paulo

Espécies	Cariótipo	RON		Localidade	Referência
		Nitrato de Prata	Sonda de DNAr 18S		
<b>Subfamília Acanthoeteninae</b>					
<i>Nothroctenus sp.</i>	29, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0			Rio Claro, SP Altônia, PR	Araújo et al. 2014
<i>Viracucha andicola</i>	29, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0	Múltiplas	Simples Simples	Carapicuíba, SP Londrina, PR Céu Azul, PR	Araújo et al. 2014
<b>Subfamília Cteninae</b>					
<i>Anahita fauna</i>	29, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0			Taiwan	Chen, 1999
<i>Ctenusornatus</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Simples		Embu-Guaçu, SP São Paulo Vargem Grande Paulista Ubatuba, SP Londrina, PR Céu Azul, PR Foz do Iguaçu, PR Londrina, PR	Araújo et al. 2014 Oliveira et al. 1997 Presente Estudo
<i>Ctenus medius</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0		Simples	São Paulo, SP	Presente estudo
<i>Ctenus sp.</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0			Rio Claro, SP	Araújo et al. 2014
<i>Phoneutria nigriventer</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Simples Simples		Taubaté, SP Londrina, PR Céu Azul, PR Foz do Iguaçu, PR Altônia, PR	Araújo et al. 2014 Presente estudo
<i>Parabatina brevipes</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0				Araújo et al. 2014
<b>Subfamília Acantheinae</b>					
<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	28, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0		Simples	Céu Azul, PR	Presente estudo
<b>Subfamília Viridasiinae</b>					
<i>Astenoctenus Borelli</i>	22, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0			Ilha Grande, Guaíra, PR Ilha São Francisco, Guaíra, PR	Araújo et al. 2014



1 **Tabela 2.** Espécies analisadas e locais de coleta, Brasil. PR = Paraná; SP = São Paulo. ♂ = machos

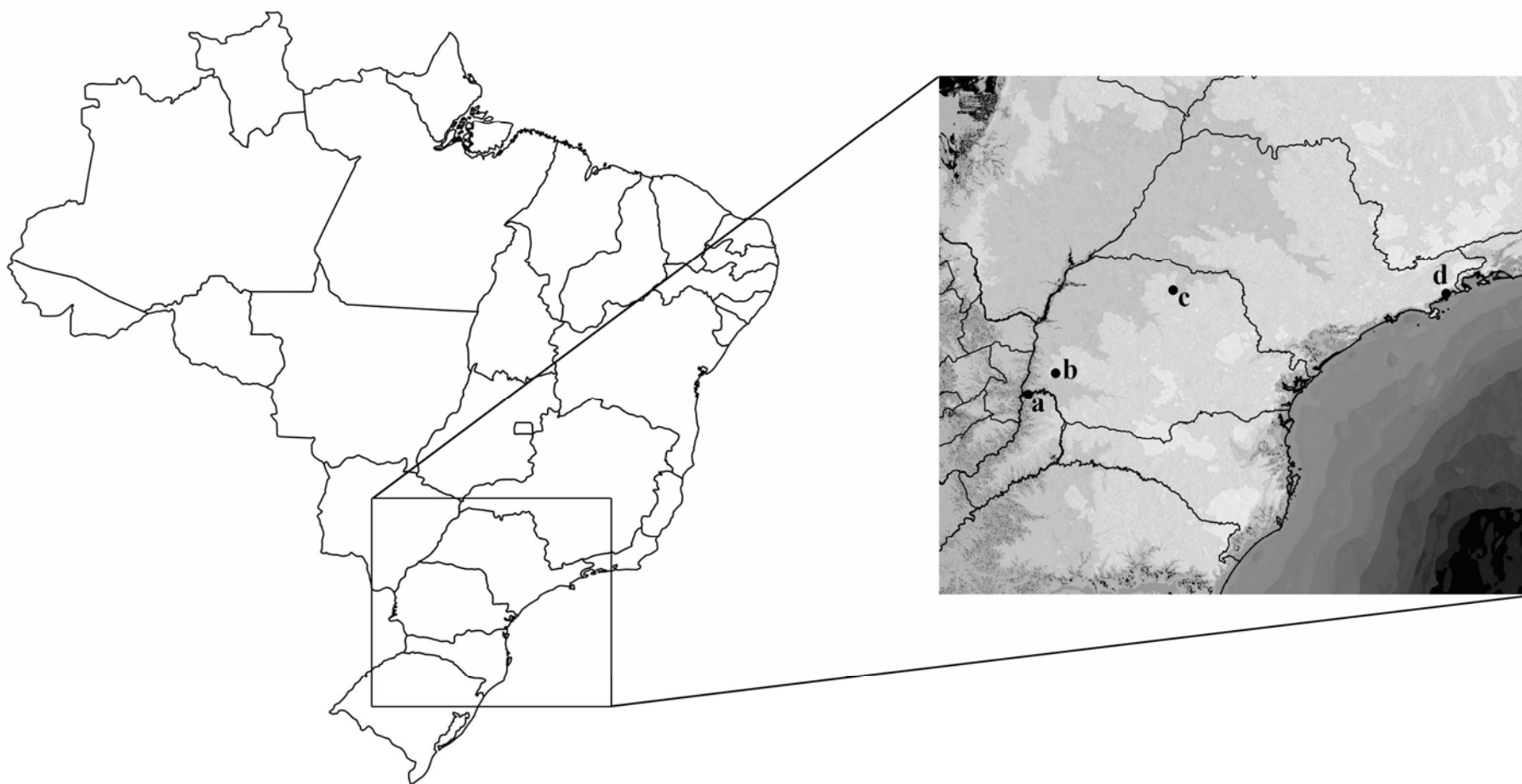
Subfamílias/Espécies	Amostra (♂)	Local de coleta
<b>Subfamília Acanthoeteninae</b>		
<i>Viracucha andicola</i>	2	Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	5	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
<b>Subfamília Cteninae</b>		
<i>Ctenus ornatus</i>	2	Foz do Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°37'41.2"S 54°27'47.2"W)
	14	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	11	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
	4	Ubatuba, SP (23°24'14.3"S 45°03'54.0"W)
<i>Ctenus medius</i>	5	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
<i>Phoneutria nigriventer</i>	1	Foz do Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°37'41.2"S 54°27'47.2"W)
	1	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)
	4	Londrina, PR (23°19'37.5"S 51°12'13.4"W)
<b>Subfamília Acantheinae</b>		
<i>Enoploctenus cyclothorax</i>	3	Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu, PR (25°09'15.8"S 53°50'42.1"W)



**Tabela 3.** Dados de região organizadora de nucléolos (RONs) identificada por impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) e por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) em diferentes espécies de aranhas,

Família	Espécie	Nº de RONs	Metodologia	Referência
Agelenidae	<i>Tetrax denticulata</i>	1	AgRON	Král 1995
Antrodietidae	<i>Aliatipus californicus</i>	2	AgRON	Král et al. 2013
Ctenidae	<i>Ctenus ornatus</i>	1	AgRON	Araujo et al. 2014
Ctenidae	<i>Phoneutria nigriventer</i>	1	AgRON	Araujo et al. 2014
Ctenidae	<i>Viracucha andicola</i>	2	AgRON	Araujo et al. 2014
Diguetidae	<i>Diguetia albolineata</i>	3	AgRON	Král et al. 2006
Dipluridae	<i>Ischnothele caudata</i>	3	AgRON	Král et al. 2013
Dipluridae	<i>Linothele megatheloides</i>	3	AgRON	Král et al. 2013
Dipluridae	<i>Euagrus lynceus</i>	2	AgRON	Král et al. 2013
Dipluridae	<i>Diplura cf. petrunkevitchi</i>	2	AgRON	Král et al. 2011
Disderidae	<i>Dysdera crocata</i>	1	AgRON	Benavente e Wettstein 1980
Hypochilidae	<i>Hypochilus pococki</i>	2	AgRON	Král et al. 2006
Lycosidade	<i>Wadicosa fidelis</i>	10	FISH	Forman et al. 2013
Lycosidade	<i>Tricca lutetiana</i>	2	AgRON	Dolojs et al. 2011
Lycosidade	<i>Xerolycosa nemoralis</i>	2	AgRON	Dolojs et al. 2011
Lycosidade	<i>Arctosa alpigena lamperti</i>	2	AgRON	Dolojs et al. 2011
Mecicobothriidae	<i>Megahexura fulva</i>	1	AgRON	Král et al. 2013
Nemesiidae	<i>Acanthogonatus pissii</i>	2	AgRON	Král et al. 2013
Nephilidae	<i>Nephila clavipes</i>	4	AgRON	Araujo et al. 2015
Nephilidae	<i>Nephila sexpunctata</i>	8	AgRON	Araujo et al. 2015
Nephilidae	<i>Nephilingys cruentata</i>	3	AgRON	Araujo et al. 2005
Ochyroceratidae	<i>Ochyrocera sp.</i>	2	AgRON	Král et al. 2006
Oxyopidae	<i>Oxyopes salticus</i>	3	AgRON	Stávale et al. 2011
Oxyopidae	<i>Hamataliwa sp.</i>	2	AgRON	Stávale et al. 2011
Pholcidae	<i>Physocyclus globosus</i>	3	AgRON	Oliveira et al. 2007
Pholcidae	<i>Crossopriza lyoni</i>	1	AgRON	Oliveira et al. 2007
Scytodidae	<i>Scytodes fusca</i>	1	AgRON	Araujo et al. 2008
Scytodidae	<i>Scytodes itapevi</i>	1	AgRON	Araujo et al. 2008
Scytodidae	<i>Scytodes thoracica</i>	1	AgRON	Král et al. 2006
Scytodidae	<i>Scytodes globula</i>	2	AgRON	Araujo et al. 2008
Sparassidae	<i>Polibetes rapidicus</i>	2	AgRON	Rodrigues-Gil et al. 2007
Sparassidae	<i>Polibetes pythagoricus</i>	2	AgRON	Rodrigues-Gil et al. 2007
Tetrablemmidae	<i>Monoblemma muchmorei</i>	2	AgRON	Král et al. 2006
Tetragnathidae	<i>Meta menardi</i>	1	AgRON	Král et al. 2011
Theraphosidae	<i>Brachypelma albopilosum</i>	1	FISH	Král et al. 2013
Theraphosidae	<i>Pterinochilus murinus</i>	1	AgRON	Král et al. 2013
Theraphosidae	<i>Idiothele mira</i>	1	AgRON	Král et al. 2013

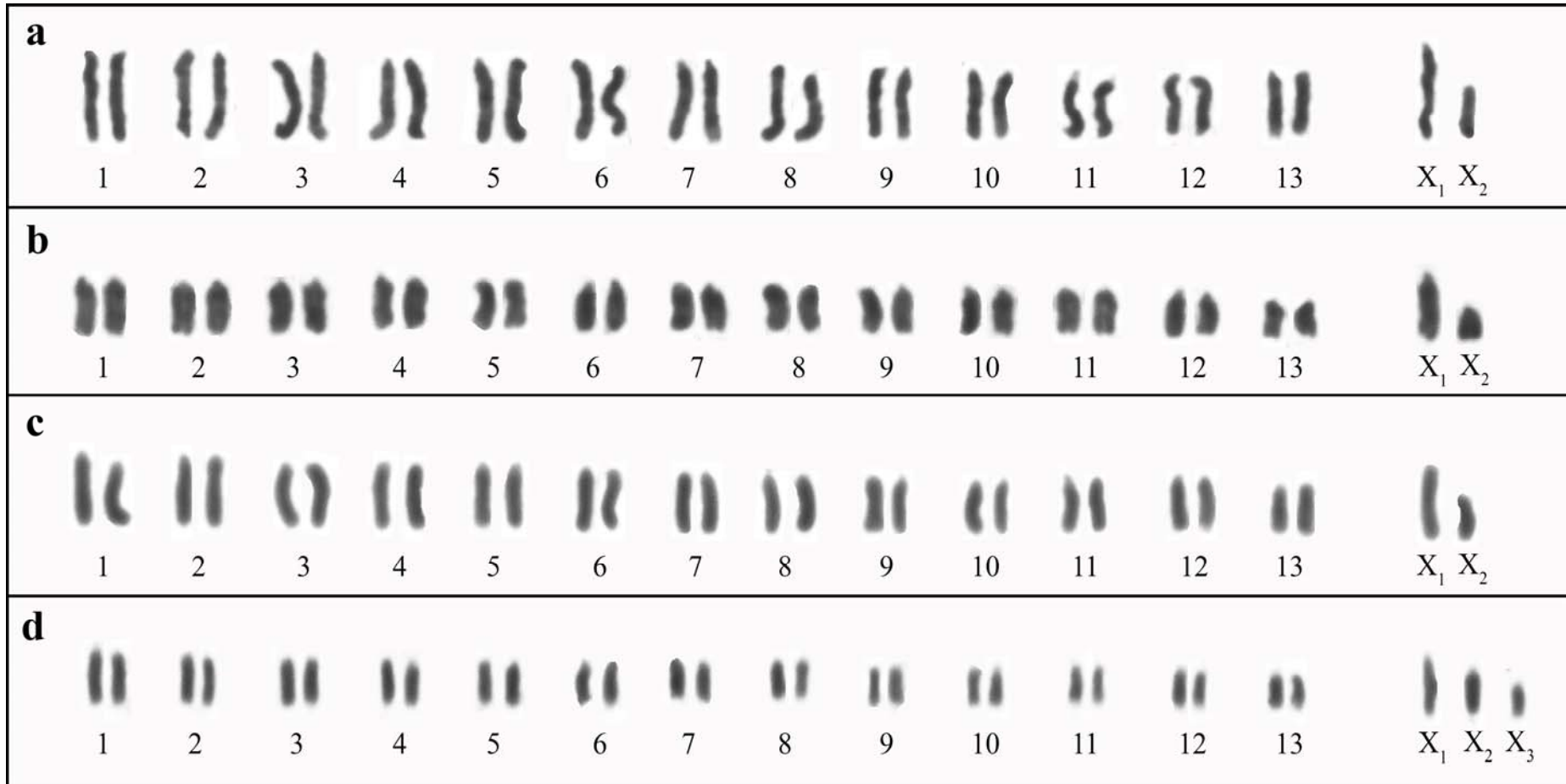




1

**Figura 1.** Mapa do Brasil indicando os locais de coleta dos espécimes: **a** Foz do Iguaçu-Paraná; **b** Céu Azul-Paraná; **c** Londrina-Paraná; **d** Ubatuba-São Paulo

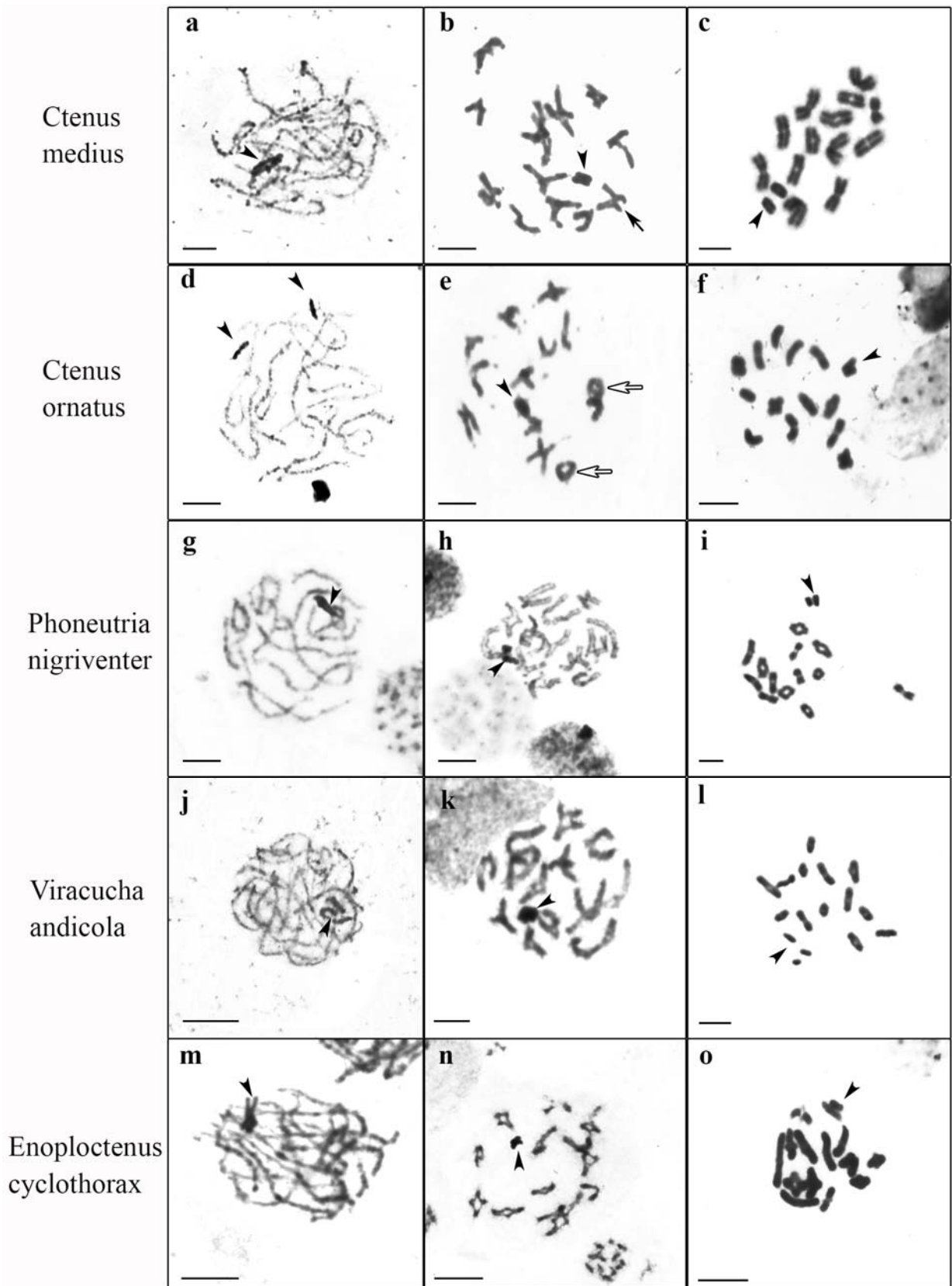




1

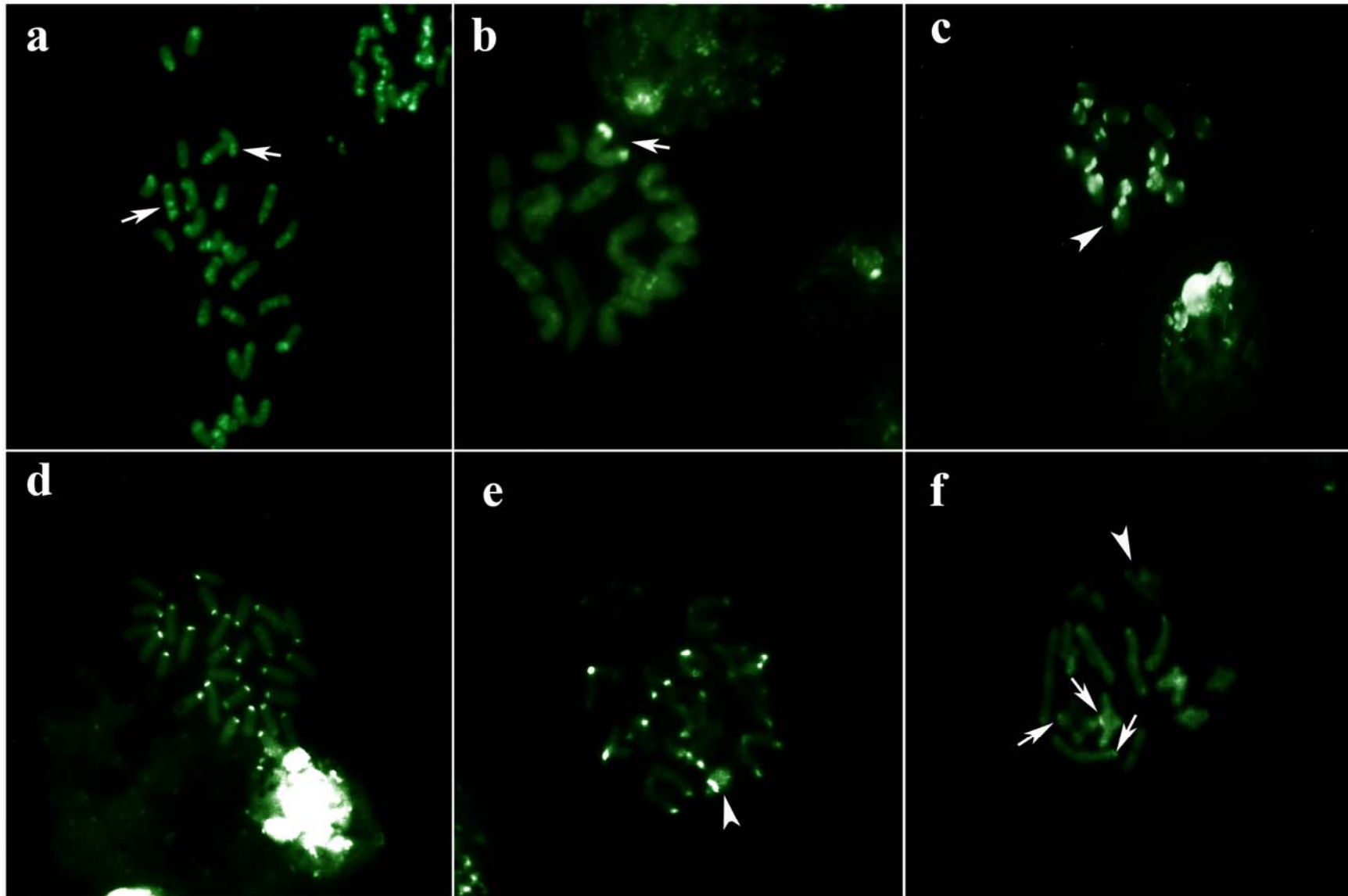
**Figura 2.** Cariótipo de metáfases mitóticas de células espermatogoniais. **A** *Ctenus ornatus*; **b** *Ctenus medius*; **c** *Phoneutria nigriventer*; **d** *Viracucha andicola*. Barra = 10  $\mu$ m





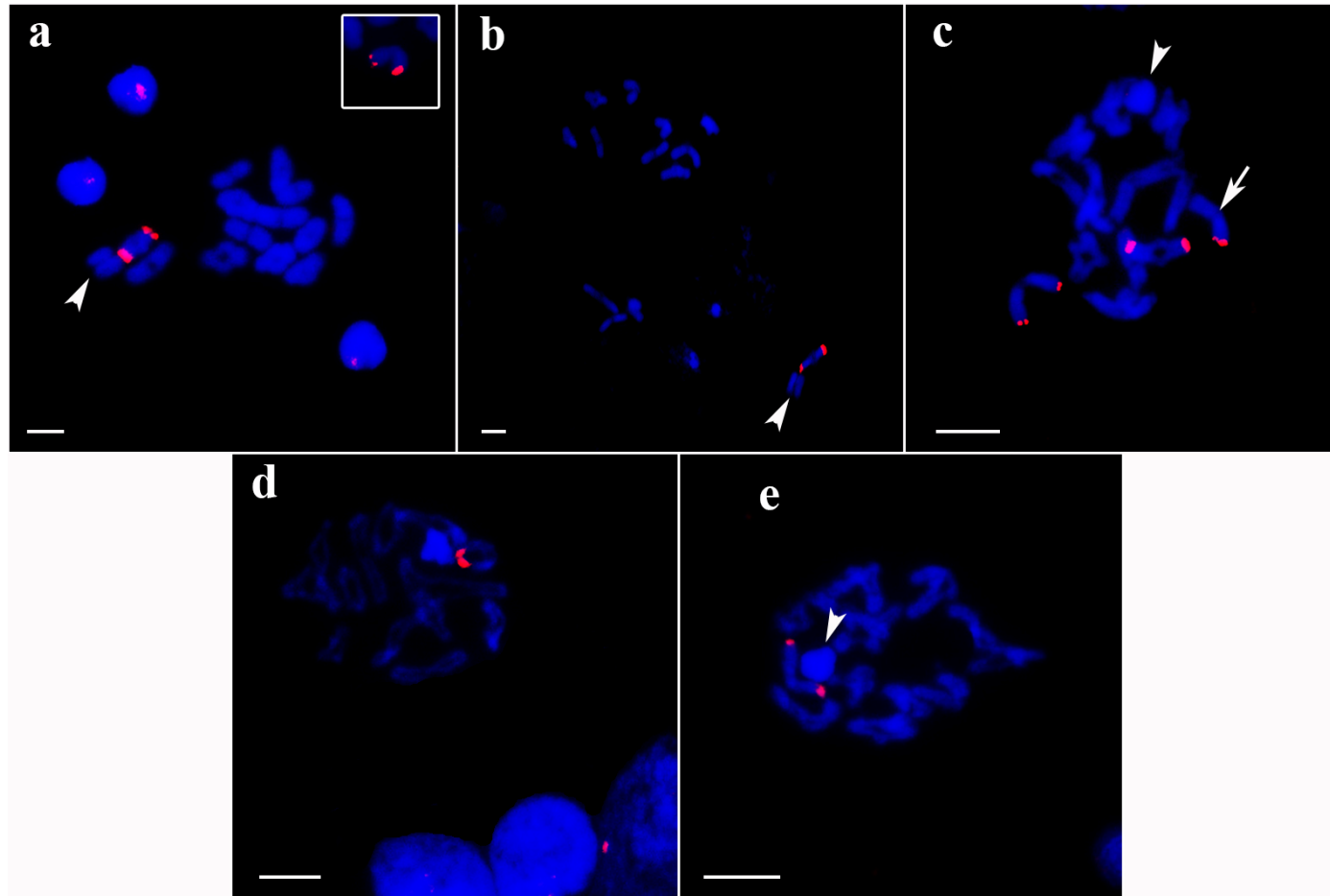
**Figura 3.** Células meióticas coradas com Giemsa. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. **a-c** *Ctenus medius*; **d-f** *Ctenus ornatus*; **g-i** *Phoneutria nigriventer*; **j-l** *Viracucha andicola*; **o** *Ctenus medius*; **m-o** *Enoploctenus cyclothorax*. Os paquítenos (**a, d, g, j, m**) evidenciam os cromossomos sexuais heteropicnóticos positivos. As células em diplóteno (**b, e, h, k, n**) mostram os cromossomos sexuais pareados em paralelo (cabeças de seta) e a presença de bivalentes com um (**b**) (setas pretas) ou dois (**e**) quiasmas (setas brancas). As células em diacinese comprovam o número de bivalentes e cromossomos sexuais: *C. medius* (**c**), *C. ornatus* (**f**), *P. nigriventer* (**i**) e *E. cyclothorax* (**o**) com 13 bivalentes +  $X_1X_2$  e *V. andicola* (**l**) com 13 bivalentes +  $X_1X_2X_3$ ; em (**f, i, o**) cromossomos sexuais pareados em paralelo e em (**c, l**) aparecem isolados entre si. Em Barra = 10  $\mu$ m





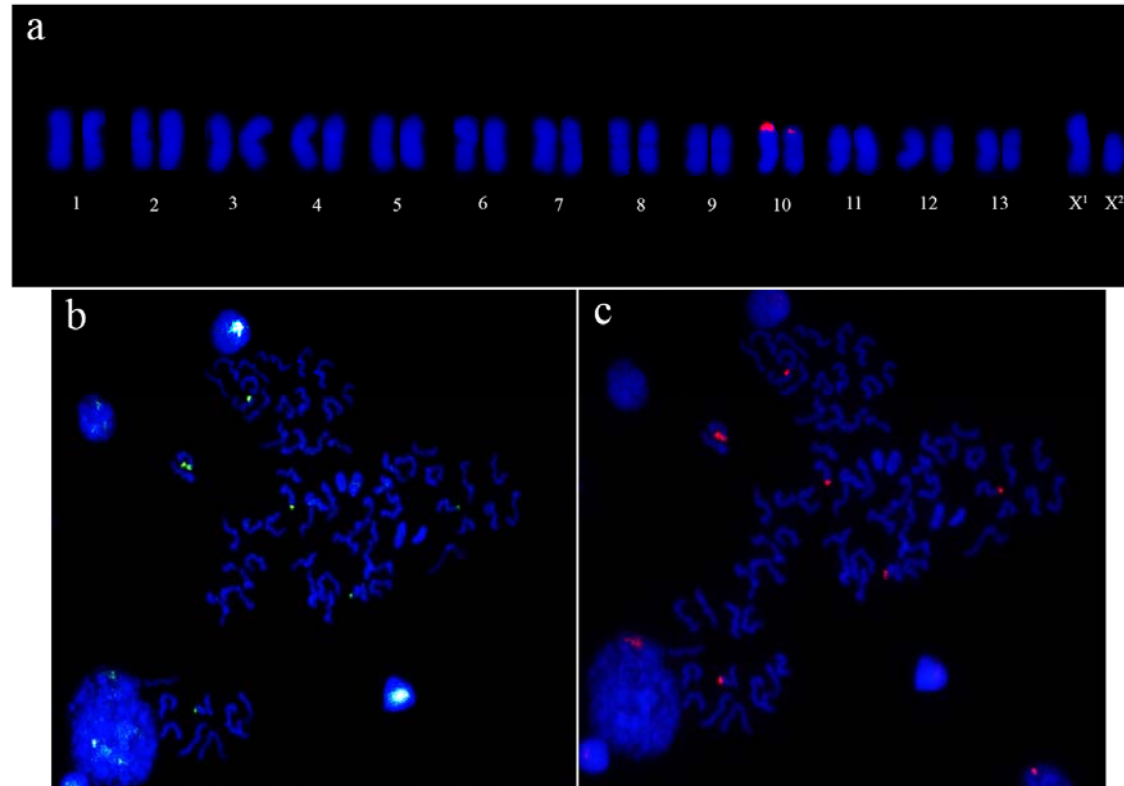
**Figura 4.** Células meióticas e mitóticas submetidas ao bandamento-C coradas com fluorocromo base-específico CMA<sub>3</sub>. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. **a** metáfase mitótica de *Tenuus ornatus*, mostrando 28 cromossomos, as setas apontam bandas intersticiais; **b** diacinese de *Tenuus ornatus*, da população de Ubatuba, a seta aponta o bivalente com acúmulo de heterocromatina GC rica; **c** diacinese de *Tenuus medius*, **d** metáfase mitótica de *Phoneutria nigriventer*; **e** diacinese de *Viracucha andicola*, as três espécies com blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pericentroméricos em todos os cromossomos; **f** diacinese de *Enoploctenus cyclothorax*, com pouca heterocromatina pericentromérica: as setas apontam regiões heterocromáticas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Barra = 10 μm





1 **Figura 5.** Células meióticas submetidas à hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. As cabeças de seta apontam os cromossomos sexuais. (a) diacinese de *Ctenus*  
 2 *ornatus*, no detalhe o heteromorfismo de tamanho dos sítios de DNAr 18S entre os homólogos; (b) diacinese de *Ctenus medius*; (c) diacinese de *Phoneutria nigriventer*; (d) diplóteno  
 3 de *Viracucha andicola*; (e) diplóteno de *Enoploctenus cyclothorax*. Barra = 10  $\mu$ m





**Figura 6.** Células de *Ctenus ornatus*. **a** Londrina, PR; **b-c** Ubatuba, SP. **(a)** cariótipo da FISH de metáfase mitótica, mostrando o par cromossômico 10 portador dos sítios de DNAr 18S; **(b)** células em metáfase II com sobreposição de DAPI/CMA<sub>3</sub>, evidenciando os cromossomos que possuem o acúmulo de heterocromatina GC rica (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>); **(c)** sobreposição de DAPI/FISH, FISH sequencial na mesma células em metáfase II, mostrando que os sítios de acúmulo de heterocromatina GC rica correspondem aos sítios de DNAr 18S



## Referências Bibliográficas

- Araújo D, Cella DM, Brescovit AD. 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 (2005)
- Araujo D, Rheims CA, Brescovit AD, Cella DM. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae) 46: 89-95 (2008)
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. Sex Chromosomes and meiosis in spiders: a review. *Meiosis—Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*: 87-108 (2012)
- Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM. Comparative cytogenetics of seven Ctenidae species (Araneae). *Zoological Science* 31: 83-88 (2014)
- Araujo D, Paula-Neto E, Brescovit AD, Cella DM, Schneider MC. Chromosomal similarities between Nephidae and Tetragnathidae indicate unique evolutionary traits among Araneioidea. *Italian Journal of Zoology*:1-8 (2015)
- Araujo D, Schneider MC, Paula-Neto E, Cella DM. The spider cytogenetic database. Available in: <[www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase)>. Accessed in: 20/02/2016 (2016)
- Benavente R, Wettstein R. An ultrastructural cytogenetic study on the evolution of sex chromosomes during spermatogenesis of *Lycosamalitiosa* (Arachnida). *Chromosoma* 64: 255–277 (1977)
- Benavent R, Wettstein R. Ultrastructural Characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage. *Chromosoma* 77: 69-81 (1980)
- Brescovit AD and Simó M. On the Brazilian Atlantic Forest species of the spider genus *Ctenus* Walckenaer, with the description of a neotype for *C. dubius* Walckenaer (Araneae, Ctenidae, Cteninae). *Arachnology*14: 1-17 (2007)
- Chen SH. Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). *Zoological Studies* 38: 423-434 (1999)
- Dias SC, Brescovit AD, Couto ECG, Martins CF. Species richness and seasonality of spiders (Arachnida, Araneae) in an urban atlantic forest fragment in northeastern Brazil. *Urban Ecosyst* 9: 323-335 (2006)
- Dolojs P, Korínková T, Musilová J, Opatová V, Bucha J, Král J. Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology* 108:1-16 (2011)



- Ferro DAM, Néo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110:55-62 (2001)
- Forman M, Nguyen P, Hula V, Král J. Sex Chromosome Pairing and Extensive NOR Polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetic and Genome Research* 141: 43-49 (2013)
- Gouveia JG, Moraes VPO, Sampaio TR, Rosa R, Dias AL. Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Review in Fish Biology and Fisheries* 23:215-227 (2013)
- Howell WM and Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015 (1980)
- Král J. The karyotype studies in central Europe's species of the superfamilies Amaurobioidea and Dictynoidae (Araneida). *Proceedings of the 15<sup>th</sup> European Colloquium of Arachnology*: p. 224 (1995)
- Král J, Musilová J, Šťáhlavský F, Řezáč M, Akan Z. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Res* 14: 859–880 (2006)
- Král J, Korínková T, Forman M, Krkavcová L. Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenet Genome Res* 133:43–66 (2011)
- Korínková T, Král J. Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders. *Spider Ecophysiology*. 1st Ed. Springer: 159-171 (2013)
- Lewinshon TM, Freitas AVL, Prado PI. Conservation of terrestrial invertebrates and their habitats in Brazil. *Conservation Biology* 19: 640-645 (2005)
- Mayers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 43:853-858 1999
- Niwa OMS, Miki. Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *The EMBO journal* 19: 3831-3840 (2000)
- Oliveira EG, Cella DM, Brescovit AD. The karyotype of *Loxosceles gaucho* and *Ctenus ornatus* (Arachnida, Araneae, Sicariidae, Ctenidae). *Rev Bras Genet* 18: 128 (1997)
- Oliveira RM, Jesus AN, Brescovit AD, Cella MD. Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocylus globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae. Haplogynae, Pholcidae). *Journal of Arachnology* 35:293-306 (2007)
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938 (1986)



- Polotow D, Brescovit AD. Phylogenetic analysis of the tropical wolf spider subfamily Cteninae (Arachnida, Araneae, Ctenidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 170: 333-361 (2014)
- Ramalho MO, Araujo D, Schneider MC, Brescovit AD, Cella DM. *Mesabolivar brasiliensis* (Moenkhaus 1898) and *Mesabolivar cyaneotaeniatu*s (Keyserling 1891) (Araneomorphae, holcidae): close relationship reinforced by cytogenetic analyses. *Journal of Arachnology* 36:453-456 (2008)
- Ramírez MJ. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae: Araneomorphae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 390: 1-374 (2014)
- Reeves A e Tear J. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure> (2000)
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian atlantic forest: how much is left, and how is remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation* 142: 1141-1153 (2009)
- Rodríguez Gil SG, Merani MS, Scioscia CL, Mola LM. Cytogenetic in three species of *Polybetes* Simon 1897 from argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *Journal of Arachnology*, 35:227-237 (2007)
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome region in Anura. *Chromosoma* 77: 83–103 (1980)
- Schweizer D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 27: 190–193 (1980)
- Silva DD. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 274: 1–86 (2003)
- Stávale, LM, Schneider, MC, Brescovit, a D, Cella, DM. Chromosomal characteristics and karyotype evolution of Oxyopidae spiders (Araneae, Entelegynae). *Genetics and molecular research* 10: 752-763 (2011)
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306 (1972)
- Suzuki G, Kubota S. 5S ribosomal DNA cluster of a lynx spider *Oxyopes sertatus* includes a histone H2B-like gene in the spacer region (NTS). *Chromosome Science* 14: 3-8 (2011)
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 1-5 (2013)
- Zaho Y, Ayoub NA, Hayashi CY. Chromosome mapping of dragline silk genes on the genomes of widow spider (Araneae, Theridiidae). *PLoS ONE* 5: e12804 (2010)
- World Spider Catalog. The world spider catalog, version 17.0. American Museum of Natural History. Available in: <<http://www.wsc.nmbe.ch>>. Accessed in: 09/03/2016 (2016)



## 1 **Considerações Finais**

2 Além de trazer a primeira descrição cariotípica para duas espécies, *Ctenus medius* e  
3 *Enoploctenus cyclothorax*, e acrescentar mais uma subfamília, Acantheinae, à lista de  
4 subfamílias de Ctenidae com descrição citogenética, o presente estudo também permitiu  
5 concluir que:

6 1- A presença de heterocromatina GC rica, predominantemente pericentromérica, em  
7 todas as espécies, demonstrou que este possa ser um padrão para as espécies da família  
8 Ctenidae.

9 2- *Ctenus ornatus* e *Ctenus medius*, quando juvenis, são espécies difíceis de distinguir  
10 morfológicamente, contudo *C. ornatus* apresentou um padrão de diversas bandas  
11 heterocromáticas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> intersticiais, além das pericentroméricas. Assim, a utilização de  
12 fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub> e DAPI) mostrou ser uma metodologia eficiente em  
13 diferenciar as duas espécies.

14 3- A Subfamília Cteninae, possui o padrão de 2n=28 para a maior parte das espécies  
15 analisadas, exceto *Anahita fauna*, considerada por diversos autores como sendo basal na  
16 filogenia de Ctenidae. De modo que os dados citogenéticos corroboram as filogenias, e  
17 demonstram a necessidade de uma revisão filogenética para este gênero, uma vez que a  
18 subfamília Cteninae é considerada derivada.

19 4- A maior parte das espécies analisadas mostrou apenas um par cromossômico  
20 portador de RONS o que, provavelmente, corresponde a um padrão plesiomórfico na família.

5- A fragmentação do bioma Mata Atlântica pode estar influenciando nas divergências  
interpopulacionais observadas nas espécies da família Ctenidae, *Ctenus ornatus* e *Viracucha  
andicola*, uma vez que pode estar causando o isolamento geográfico entre as espécies.

