

# **PROJETO DE PESQUISA**

**Estudo citogenético em espécies de aranhas das famílias Ctenidae,  
Lycosidae e Sparassidae de diferentes localidades**

## PARTE CIENTÍFICA

### 1. Título

Estudo citogenético em espécies de aranhas das famílias Ctenidae, Lycosidae e Sparassidae de diferentes localidades

### 2. Equipe de trabalho

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias (Coordenadora): responsável pelas técnicas de bandamento cromossômico

Profa. Dra. Renata da Rosa (Colaborador): responsável pela técnica de hibridação in situ

Mestrando Matheus Pires Rincão (Colaborador): responsável pelas coletas, análise meiótica convencional e de bandamento cromossômico

Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano (Consultora): responsável pela análise meiótica convencional.

### 3. Fundamentação Teórico-Methodológica

#### 3.1 - Características Gerais e Citogenéticas da ordem Araneae

A ordem Araneae está dividida, segundo o catálogo taxonômico de Platnick (2014), em 112 famílias, 3.924 gêneros e 44.540 espécies. Representantes de 65 famílias (aproximadamente 54% do total descrito) já foram estudados do ponto de vista citogenético, perfazendo um total de 277 gêneros (ca 7%) e 771 espécies (ca 2%). A seguir, um breve relato das características citogenéticas das famílias brasileiras de aranhas, com base em Araujo (2007) e atualizadas a partir de Araujo (2014), agrupadas de acordo com suas afinidades filogenéticas (o número de gêneros e espécies mencionado após o nome de cada família refere-se ao número dessas categorias descritas taxonomicamente para o grupo).

#### Mygalomorphae

**Ctenizidae** (9 gêneros e 121 espécies) e **Cyrtacheniidae** (18 gêneros e 126 espécies)

Ambas famílias pertencem a Rastelloidina (Coddington & Levi, 1991) (figura 01); no entanto, Cyrtacheniidae ocupa a posição mais basal no grupo e Ctenizidae está em posição intermediária. Dados citogenéticos foram registrados somente para três espécies da família Ctenizidae que apresentou uma ampla variação no número diploide de  $2n = 42$  em *Cycloscmia torreyi* Gertsh & Platnick, 1975 (Hetzler, 1979) a  $2n = 128$  em *Cycloscmia siamensis* Schwendinger, 2005 (Král et al., 2013). Cyrtacheniidae possui apenas 2 espécies cariotipadas onde foi encontrado  $2n = 86$  em *Ancylotrypa sp* e  $2n = 42$  em *Ancylotrypa cf. fossor*, por Král et al. (2013).

**Dipluridae** (24 gêneros e 175 espécies) e **Theraphosidae** (113 gêneros e 900 espécies)

Entre os Tuberculotae, Dipluridae, que é basal em relação a Theraphosidae (Coddington & Levi, 1991), possui o número diplóide variando de  $2n = 14$  em *Ischnothele caudata* e  $2n = 90$  em *Diplura cf. pentrunkevitchi*. Theraphosidae que constitui a família mais derivada deste clado, possui 13 gêneros e 19 espécies estudadas, cujo número diploide variou de  $2n=16$  a  $2n=110$ . Pode-se destacar nesta família que, apesar de uma exceção no gênero *Vitalius*, números diplóides encontrados até o momento são gênero-específicos.

## **Infraordem Araneomorphae**

### **Filistatidae** (16 gêneros e 110 espécies)

Esta família encontra-se na posição mais basal entre as haploginas (Coddington & Levi, 1991; Platnick et al., 1991; Ramírez, 2000), com quatro espécies cariotipadas pertencentes a dois gêneros, as quais exibiram  $2n=24=22+X_1X_2$  e  $2n=25=22+X_1X_2Y$  no gênero *Kukulcania* e  $2n=33=30+X_1X_2Y$  no gênero *Filistata*, com cromossomos meta/submetacêntricos. É interessante notar que o número diplóide de  $2n=24$ , compreendendo cromossomos meta/submetacêntricos, corresponde a metade daquele de algumas migalomorfas com cromossomos acro/telocêntricos. Existe a possibilidade de que a espécie descrita como portadora de sistema  $X_1X_2$  presente, na verdade, sistema de cromossomos sexuais (SCS) do tipo  $X_1X_2Y$ , pois em uma descrição anterior do cariótipo desta mesma espécie (Hetzler, 1979), foi mencionada a presença de um cromossomo Y, sem que o autor fornecesse mais detalhes, sendo este o registro mais antigo existente na literatura em relação a ocorrência do cromossomo sexual Y para a ordem Araneae.

### **Segestriidae** (3 gêneros e 106 espécies)

Pertencente à superfamília Dysderoidea com onze espécies cariotipadas, os representantes desta família mostraram os números diplóides mais baixos de toda a ordem Araneae ( $2n=7$  a  $2n=14$ ). Uma particularidade desse grupo é a presença, quase que exclusivamente, de cromossomos holocêntricos. Cromossomos desse tipo foram descritos de forma isolada em apenas uma espécie pertencente a Araneidae e uma a Oxyopidae. Estudos citogenéticos em representantes das outras duas famílias de Dysderoidea (Oonopidae e Orsolobidae) são importantes e muito interessantes para confirmar ou não, a presença de cromossomos holocêntricos como uma sinapomorfia para a superfamília como um todo.

### **Tetrablemmidae** (29 gêneros e 126 espécies)

De acordo com os trabalhos cladísticos de Coddington & Levi (1991) (figura 02) e Platnick et al. (1991), esta família seria grupo-irmão de Dysderoidea (Fig. 2), ao passo que a análise de Ramírez (2000) a coloca como grupo-irmão de um clado que inclui Pholcidae(Diguetidae+Plectreuridae). A única espécie de Tetrablemmidae cariotipada, *Monoblemma muchmorei* Shear, 1978, mostrou  $2n=23=22+X$ , com cromossomos metacêntricos. O trabalho citogenético de Král et al. (2006), que realizaram a análise da referida espécie e outras, agrupa Tetrablemmidae com Leptonetidae e Ochyroceratidae, baseado no comportamento do cromossomo X durante a prófase I nos machos.

### **Diguetidae** (2 gêneros e 15 espécies)

Estudos cromossômicos foram realizados em duas espécies nesta família, mostrando um número diplóide que variou de  $2n=16$  a  $2n=20$ . O SCS era do tipo XY nas duas espécies. De acordo com o trabalho citogenético de Král et al. (2006), o sistema XY encontrado em Diguetidae seria derivado de um do tipo  $X_1X_2Y$  e não a partir do  $X_1X_2$  encontrado em Plectreuridae (grupo irmão), levantando a possibilidade de que Diguetidae e Plectreuridae não pertencem a um mesmo clado.

### **Pholcidae** (81 gêneros e 967 espécies)

Esta representa a maior família entre aquelas de Haplogynae (Coddington & Levi, 1991; Platnick et al., 1991; Ramírez, 2000) e possui somente 25 espécies estudadas

cariologicamente, as quais revelaram uma grande variação no número diplóide, de  $2n=15$  a  $2n=32$ . O SCS prevalecente foi o do tipo X mas, os tipos  $X_1X_2$  e  $X_1X_2Y$  também foram registrados para algumas espécies. A morfologia cromossômica foi predominantemente metacêntrica. Segundo Král et al. (2006), o SCS do tipo  $X_1X_2Y$  pode não ter sido identificado em alguns casos, tal como em *Spermophora senoculata* Dugès, 1836, levando à descrição de um sistema do tipo  $X_1X_2$ . Um aumento da representatividade dos dados citogenéticos, com análises dos diversos clados de Pholcidae ainda não estudados, poderá contribuir no estabelecimento de relações entre os cariótipos encontrados dentro da família.

### **Ochyroceratidae** (13 gêneros e 146 espécies)

Em Ochyroceratidae, a única espécie cariotipada, *Ochyocera* sp. mostrou  $2n=13=12+X$  e cromossomos metacêntricos. Muitos estudos ainda se fazem necessários e a relação filogenética descrita entre Ochyroceratidae e Leptonetidae, ainda não pôde ser avaliada por dados morfológicos.

### **Drymusidae** (1 gênero e 14 espécies), **Scytodidae** (5 gêneros e 182 espécies) e **Sicariidae** (2 gêneros e 122 espécies)

A família Sicariidae é grupo-irmão de Scytodidae+Drymusidae (Coddington & Levi, 1991; Platnick et al., 1991; Ramírez, 2000). A família Drymusidae possui apenas uma espécie analisada citogeneticamente, a qual apresentou  $2n=37=34+X_1X_2Y$  e cromossomos meta/submetacêntricos. Em Scytodidae, cinco espécies identificadas tiveram seu cariótipo analisado, mostrando uma variação de  $2n=31=30+X$  e  $2n=13+X$ . Em algumas espécies, a morfologia cromossômica foi exclusivamente meta/submetacêntrica, em outras exclusivamente acrocêntrica, ao passo que outras mostraram um complemento composto pelas duas categorias de cromossomos. Além disso, uma espécie não identificada apresentou  $2n=26$ . Em Sicariidae apenas sete espécies do gênero *Loxosceles* Keyserling, 1880 foram cariotipadas, com número diplóide variando de  $2n=18$  a  $2n=23$  e incluindo um SCS do tipo  $X_1X_2Y$  na maioria das espécies e do tipo  $X_1X_2$  em outras. A morfologia cromossômica era predominantemente meta/submetacêntrica.

### **Eresidae** (10 gêneros e 101 espécies), **Hersiliidae** (11 gêneros e 156 espécies) e **Oecobiidae** (6 gêneros e 102 espécies)

Estas famílias formam a superfamília Eresoidea que está entre os clados mais basais de Entelegynae, sendo que Eresidae é considerado grupo-irmão das outras duas famílias (Coddington & Levi, 1991; Griswold et al., 1999). Nesta superfamília, ocorrem números cromossômicos relativamente altos, variando de  $2n=22$  a  $2n=43$ , com predominância de números diplóides a partir de 30 cromossomos. Com exceção de duas espécies de Oecobiidae e uma de Eresidae que apresentaram SCS do tipo  $X_1X_2X_3$ , o qual evolutivamente apareceu pela primeira vez neste grupo dentre as aranhas, as outras exibiram SCS do tipo  $X_1X_2$ . Entretanto, deve-se ressaltar que as análises citogenéticas realizadas em Hersiliidae e Eresidae restringem-se a apenas uma e quatro espécies respectivamente, englobando somente um gênero por família, ao passo que em Oecobiidae, os estudos envolveram quatro espécies pertencentes a dois gêneros. Os cromossomos revelaram-se acrocêntricos em todas as espécies que tiveram a morfologia cromossômica analisada.

### **Mimetidae** (12 gêneros e 152 espécies)

A família Mimetidae ocupa a posição mais basal entre os Palpimanoidea (Coddington & Levi, 1991; Griswold et al., 2005) e é a única representante dessa superfamília que tem algum táxon citogeneticamente estudado; as outras oito famílias que fazem parte de Palpimanoidea compreendem poucas espécies, as quais têm distribuição geográfica restrita. Com apenas uma espécie cariotipada, Mimetidae apresenta características cromossômicas semelhantes às daquelas de muitas outras espécies pertencentes a diversas famílias de Araneoidea, ou seja,  $2n=24=22+X1X2$ , com cromossomos acrocêntricos.

#### **Uloboridae** (18 gêneros e 263 espécies)

Esta família pertence à superfamília Deinopoidea, juntamente com Deinopidae que, até o momento, não existem dados cariotípicos sobre esta última família. A superfamília como um todo é grupo-irmão de Araneoidea (Coddington & Levi, 1991; Scharff & Coddington, 1997; Griswold et al., 1998, 1999, 2005). Com oito espécies de três gêneros cariotipadas, distingue-se claramente das araneoideas por apresentar número diplóide que varia de  $2n=10$  a  $2n=22$ , com predominância de  $2n$  abaixo de 20 cromossomos, ao passo que as famílias de Araneoidea caracterizam-se por possuírem a maioria dos representantes com  $2n=22$  ou  $2n=24$ . O SCS nas espécies de Uloboridae pode ser X, X1X2 ou X1X2X3, os quais foram também encontrados em Araneoidea. A morfologia cromossômica, quando descrita, foi do tipo acro/telocêntrica.

#### **Araneidae** (166 gêneros e 2841 espécies)

Representa a terceira maior família das aranhas quanto ao número de espécies descritas taxonomicamente e citogeneticamente. Constitui o grupo-irmão das araneoideas derivadas (Scharff & Coddington, 1997; Griswold et al., 1998) e possui 70 espécies cariotipadas pertencentes a 20 gêneros. Dessas, mais de 50 revelaram  $2n=24=22+X1X2$ ; nas demais espécies, o número diplóide variou de  $2n=13$  a  $2n=49$ . Além do SCS do tipo X1X2 que foi predominante, o tipo X ocorreu em uma frequência bem menor e os tipos X1X2X3 e XY foram registrados somente em uma espécie para cada tipo. A morfologia dos cromossomos foi acro/telocêntrica na grande maioria das espécies. Cariótipos com cromossomos predominantemente meta/submetacêntricos ocorreram quase que exclusivamente em espécies com números diplóides abaixo de 24 cromossomos, indicando redução no número cromossômico por meio de fusões cêntricas. A espécie descrita como portadora de SCS do tipo XY teve seus elementos cromossômicos caracterizados como possuidores de centrômero difuso. É interessante notar que, as espécies que apresentaram número diplóide menor que  $2n=24$  pertencem principalmente aos gêneros *Gasteracantha* Sundevall, 1833 e *Neoscona* Simon, 1864. De acordo com a filogenia de Scharff & Coddington (1997), esses gêneros pertencem a diferentes clados dentro da família, ambos em ramos bem derivados, fato que aponta para reduções independentes no número de cromossomos.

#### **Tetragnathidae** (51 gêneros e 956 espécies) e **Nephilidae** (4 gêneros e 75 espécies)

Nephilidae foi elevada ao status de família recentemente (Kuntner, 2006), sendo grupo-irmão de Tetragnathidae, na qual estava incluída anteriormente como subfamília Nephilinae (Scharff & Coddington, 1997; Griswold et al., 1998) e possui, até o momento, duas espécies pertencentes a dois gêneros, estudadas citogeneticamente. Na família Tetragnathidae, dados cariológicos estão disponíveis para 22 espécies distribuídas em seis gêneros. As duas famílias em conjunto formam um clado que é grupo-irmão de todas as outras araneoideas derivadas. Possuem diversas características em comum com Araneidae e com as outras araneoideas derivadas, como predominância de número diplóide  $2n=24$  (em 20

das 23 espécies estudadas), SCS do tipo X1X2 e cromossomos acro/telocêntricos. Outros complementos cromossômicos encontrados em menor proporção são  $2n=22$  e  $2n=25$ , bem como SCS do tipo X1X2X3 e X1X2X3X4. Ressalta-se a presença deste último tipo de sistema que, além de uma espécie de Tetragnathidae, ocorre somente em outras duas de Sparassidae.

### **Linyphiidae** (578 gêneros e 4343 espécies)

Esta é a segunda maior família das aranhas com relação ao número de espécies descritas taxonomicamente e ocupa somente a 10ª posição em termos de número de espécies cariotipadas, com estudos realizados em apenas 18 espécies de 11 gêneros. Grupo-irmão, juntamente com Pimoidae, de todos os outros táxons do clado das araneóideas com teias em lençol (Griswold et al., 1998), possui número diploide variando de  $2n=22$  a  $2n=25$ , como em Nephilidae e Tetragnathidae, e um caso isolado de  $2n=46$ . Os tipos de SCS encontrados foram, em ordem decrescente de ocorrência, X1X2, X1X2X3 e X. A morfologia cromossômica, quando descrita, mostrou ser acro/telocêntrica. Sendo assim, percebe-se que de forma geral esta família possui características cromossômicas semelhantes àquelas das araneóideas mais basais apresentadas anteriormente.

### **Nesticidae** (9 gêneros e 204 espécies) e **Theridiidae** (96 gêneros e 2267 espécies)

Formam em conjunto o clado das teridídeas que ocupa um ramo derivado entre as araneóideas, sendo grupo-irmão das ciatolípídeas (Cyatholipidae+Synotaxidae) (Griswold et al., 1998); neste último grupo, não existem registros citogenéticos. Em Nesticidae, somente uma espécie foi estudada, a qual exibiu  $2n=24=22+X1X2$ , com cromossomos acrocêntricos. Theridiidae ocupa a 6ª posição, em termos de número de espécies conhecidas taxonomicamente pela citogenética, sendo que as análises abrangem 34 espécies pertencentes a 14 gêneros. Ao contrário das araneóideas abordadas anteriormente que tem predomínio de complementos com 24 cromossomos, esta família apresenta como padrão mais constante o número diploide de  $2n=22=20+X1X2$ . Um gênero que se mostrou como uma exceção a essa regra foi *Latrodectus* Walckenaer, 1805 que exibiu grande heterogeneidade cariotípica numérica entre exemplares fêmeas estudados de quatro espécies ( $2n=16$  a  $2n=28$ ), englobando toda variação de número diplóide encontrada para a família. O SCS e a morfologia dos cromossomos foram invariavelmente X1X2 e acro/telocêntrica, respectivamente, nas espécies que tiveram estas características descritas.

### **Titanoecidae** (5 gêneros e 46 espécies)

Segundo Griswold et al. (1999), Titanoecidae constituiria, em conjunto com Phyxelididae, o clado das titanoeóideas. Esta última família não possui táxons estudados citogeneticamente, até o momento, e seus representantes têm distribuição geográfica exclusivamente africana. Em Titanoecidae somente uma espécie foi cariotipada, mostrando  $2n=30=28+X1X2$ .

### **Amaurobiidae** (71 gêneros e 660 espécies), **Cybaeidae** (12 gêneros e 146 espécies) e **Haniidae** (26 gêneros e 235 espécies)

Apesar das análises filogenéticas de Griswold et al. (1999, 2005) não incluírem Cybaeidae e Haniidae, estas famílias parecem ser relacionadas a Amaurobiidae. Esta última família possui 11 espécies distribuídas em seis gêneros, estudadas do ponto de vista citogenético, com uma relativa homogeneidade cromossômica numérica ( $2n=42$  ou  $2n=43$ ). O

SCS pode ser X1X2X3, X1X2 ou X, e a única espécie que teve a morfologia cromossômica descrita exibiu elementos acrocêntricos. Números diplóides relativamente altos foram também encontrados nas três espécies pertencentes a três gêneros diferentes de Hahniidae. Nesse caso, o número de cromossomos encontrado foi específico para cada um dos gêneros ( $2n=34$ ,  $2n=35$  e  $2n=43$ ). O SCS detectado foi X1X2X3 ou X1X2 e a morfologia dos cromossomos é acrocêntrica. Em Cybaeidae, com duas espécies caracterizadas cariologicamente, de dois gêneros, existe uma situação particular: uma espécie de um dos gêneros apresentou  $2n=42$ , número relativamente alto e semelhante aos encontrados nas duas famílias anteriores, e a outra espécie do outro gênero, representada por uma das únicas aranhas aquáticas conhecidas, *Argyroneta aquatica* Clerk, 1757, exibiu  $2n=24=22+X1X2$ , com cromossomos acrocêntricos, ou  $2n=21=20+X$ , com elementos metacêntricos.

**Agelenidae** (40 gêneros e 504 espécies), **Amphinectidae** (36 gêneros e 187 espécies) e **Dictynidae** (48 gêneros e 562 espécies)

Estas famílias formam, juntamente com Desidae, o clado com cribelo, (estrutura próxima às fiandeiras e homóloga a elas) fundido (Griswold et al., 2005). Os dados citogenéticos relativos a Agelenidae são referentes à 17 espécies pertencentes a sete gêneros e mostram números cromossômicos relativamente altos ( $2n=35$  a  $2n=±52$ ), com predominância de complementos entre 40 e 44 cromossomos, sem considerar o trabalho de Carnoy (1885). Das 17 espécies, 11 exibiram SCS do tipo X1X2 e as demais mostraram do tipo X1X2X3. Com exceção de três espécies, os cariótipos incluem somente elementos acro/telocêntricos. Amphinectidae, com apenas uma espécie cariotipada, também apresenta número diplóide relativamente alto para Araneomorphae,  $2n=40=38+X1X2$ , com cromossomos acrocêntricos.

Ao contrário das duas famílias anteriores, Dictynidae (7 espécies cariotipadas de 3 gêneros), que ocupa posição mais derivada dentro desse clado, possui representantes com números cromossômicos relativamente mais baixos ( $2n=19$  a  $2n=33$ ), com prevalência de espécies com complementos compostos por 19 a 24 cromossomos. Os três gêneros de Dictynidae analisados podem ser distinguidos pelo número diplóide, ou seja,  $2n=19$ ,  $2n=21$  a  $24$ , e  $2n=33$ . O SCS pode ser do tipo X, X1X2 ou X1X2X3. Nesta família, ao contrário das outras duas, as espécies que tiveram morfologia cromossômica descrita mostraram elementos autossômicos metacêntricos.

**Gnaphosidae** (116 gêneros e 1982 espécies) e **Trochanteriidae** (18 gêneros e 149 espécies)

Essas duas famílias formam, de acordo com Coddington & Levi (1991), o clado Gnaphosoidea (Dionycha), juntamente com outras cinco. A relação entre estas famílias dentro deste clado é incerta. Ocupando a 7ª posição em termos de maior número de espécies descritas taxonomicamente, Gnaphosidae é a 5ª família mais conhecida citogeneticamente, com 39 espécies pertencentes a 19 gêneros, cariotipadas até a presente data. O  $2n=22$  foi encontrado em 32 espécies deste total, sendo que os outros números registrados foram  $2n=21$ ,  $2n=24$  e  $2n=30$ . O SCS era do tipo X1X2 em quase todas as espécies, exceto naquelas com 21 cromossomos que possuíam SCS do tipo X. A morfologia cromossômica, quando revelada, mostrou-se do tipo acro/telocêntrica. A única espécie de Trochanteriidae analisada citogeneticamente exibiu  $2n=22=20+X1X2$ , com características idênticas às observadas na maioria das espécies de Gnaphosidae. Além deste, o único outro grupo que possui cariótipos com prevalência de 22 elementos entre todas as aranhas é Theridiidae, uma família extremamente distante filogeneticamente. A obtenção de dados cariológicos em outras famílias de Gnaphosoidea seria interessante para verificar a predominância ou não de complementos cromossômicos com 22 elementos; no entanto, das outras cinco famílias desse grupo, somente Prodidomidae possui espécies distribuídas no Brasil.

**Coriniidae** (76 gêneros e 925 espécies) e **Liocranidae** (29 gêneros e 160 espécies)

Segundo Coddington & Levi (1991), esta família está incluída em Dyonicha, e junto com Liocranidae formam um clado que é grupo-irmão da superfamília Gnaphosoidea. Os estudos citogenéticos em Corinnidae envolvem apenas cinco espécies distribuídas em três gêneros, com número diplóide oscilando entre  $2n=22$  e  $2n=26$ , SCS do tipo X1X2 e cromossomos acrocêntricos. Em Liocranidae, uma família que não ocorre no Brasil, uma única espécie estudada exibiu  $2n=22=20+X1X2$ . O complemento cromossômico contendo 22 elementos é o mais frequentemente encontrado, nos representantes cariotipados de duas famílias de Gnaphosoidea.

**Anyphaenidae** (56 gêneros e 508 espécies), **Clubionidae** (15 gêneros e 538 espécies) e **Salticidae** (560 gêneros e 5077 espécies)

De acordo com o trabalho de Coddington & Levi (1991), estas três famílias constituem um clado que é grupo-irmão das dionychas citadas anteriormente; entretanto, as relações intra-clado não estão resolvidas. Em Anyphaenidae existem estudos citogenéticos em três espécies de dois gêneros, dos quais um apresentou  $2n=26$  e o outro  $2n=20$ . O SCS era do tipo X1X2 e a morfologia cromossômica foi, quando fornecida, acrocêntrica.

Em Clubionidae, 10 espécies de um único gênero foram cariotipadas e, com exceção dos casos de ocorrência de cromossomos B, o número diplóide varia de  $2n=20$  a  $2n=26$  e o SCS foi do tipo X1X2. Os cromossomos eram acrocêntricos nas espécies em que não existiam supranumerários no complemento, e meta/submetacêntricos quando estes estavam presentes. Infelizmente, dos outros 14 gêneros de Clubionidae, cujas espécies não foram ainda caracterizadas do ponto de vista citogenético, somente um possui espécies que ocorrem no Brasil.

Salticidae, a maior família em número de espécies descritas taxonomicamente, é a 2ª família mais conhecida citogeneticamente, com 153 espécies de 37 gêneros estudadas e número diplóide oscilando entre  $2n=14$  e  $2n=30$ . O complemento com 28 cromossomos foi o mais comumente observado, ocorrendo em mais de 50% das espécies estudadas. O SCS do tipo X1X2 foi encontrado em mais de 80% das espécies e os outros tipos de sistema registrados, em ordem decrescente de frequência, foram X, X1X2X3Y e X1X2X3. Em Salticidae, os cromossomos são quase que exclusivamente acrocêntricos, com exceção da espécie com  $2n=14$ , que possuía autossomos exclusivamente metacêntricos (um caso provável de fusões cêntricas, já que outras espécies do mesmo gênero apresentaram  $2n=28$  acrocêntricos); de um autossomo metacêntrico em exemplares de uma população de *Evarcha hoyi* Peckham & Peckham, 1883 com  $2n=25$  e do cromossomo Y, que exibiu morfologia meta/submetacêntrica.

O pequeno número de gêneros analisados do ponto de vista citogenético nas duas primeiras famílias desse grupo faz com que a representatividade dos dados seja insuficiente para estabelecer qualquer hipótese robusta de relacionamento entre Anyphaenidae, Clubionidae e Salticidae.

**Philodromidae** (29 gêneros e 522 espécies), **Selenopidae** (4 gêneros e 189 espécies), **Sparassidae** (83 gêneros e 1014 espécies) e **Thomisidae** (171 gêneros e 2056 espécies)

A filogenia apresentada por Coddington & Levi (1991) mostra que estas famílias possuem posição incerta dentro de Dionycha. Philodromidae, com 16 espécies de três gêneros cariotipadas, possui número cromossômico variando de  $2n=24$  a  $2n=29$ , sendo que o complemento com 28 cromossomos é o mais frequente. Com exceção de duas espécies que

possuíam SCS do tipo X e de uma outra que exibiu do tipo X1X2X3, as outras mostraram sistema X1X2. A morfologia cromossômica, quando descrita, foi acrocêntrica.

Selenopidae, com apenas três espécies cariotipadas em dois gêneros, mostra  $2n=29=26+X1X2X3$ , com cromossomos acrocêntricos.

Os dados cariológicos em Sparassidae englobam 43 espécies de 15 gêneros e revelam grande heterogeneidade numérica, com número diplóide oscilando entre  $2n=21$  e  $2n=44$ , predominando complementos acima de 40 cromossomos. O SCS mais encontrado foi o do tipo X1X2X3, ocorrendo também, em ordem decrescente de frequência, os sistemas X1X2, X1X2X3X4 e X. Além destes, existe aquele particular de *Delena cancerides* Walckenaer, 1837, uma aranha social que possui populações com SCS do tipo X1X2X3, X1X2 e outras com múltiplos cromossomos X e Y ( $X_nY_n$ ). As populações de *D. cancerides* e outras espécies de Sparassidae que exibiram  $2n=43$  mostraram cromossomos acro/telocêntricos, ao passo que, de forma geral, quanto menor o número diplóide encontrado em outras populações de *D. cancerides* ou em outra espécie de Sparassidae, maior era o número de cromossomos metacêntricos observados no cariótipo. Dessa forma, o estudo citogenético de diversas populações desta espécie nos fornece um exemplo prático de como a evolução cromossômica nas aranhas pode ocorrer através de fusões cêntricas, seja do tipo autossomo+autossomo ou autossomo+cromossomo sexual.

A família Thomisidae possui 22 espécies cariotipadas pertencentes a 14 gêneros, com número diplóide variando de  $2n=21$  a  $2n=27$ . O complemento composto por 23 cromossomos é o mais frequente, ocorrendo em 17 espécies e todas as que possuíam 23 ou 21 cromossomos exibiram SCS do tipo X, ao passo que espécies com 27 e 24 cromossomos mostraram SCS do tipo X1X2X3 e X1X2, respectivamente. A morfologia dos elementos, quando descrita, foi do tipo acro/telocêntrica.

Considerando os dados citogenéticos apresentados para esse grupo, parece haver uma maior semelhança citológica entre os representantes de Philodromidae, com predominância de  $2n=28=26+X1X2$  e Selenopidae, com  $2n=29=26+X1X2X3$ , apesar do baixo número de espécies estudadas, ao passo que as outras duas famílias possuem características particulares. Sparassidae é composta por espécies, em sua maioria, com números diplóides altos (acima de 40) e Thomisidae, além de apresentar a maioria dos representantes com  $2n=23$  é distinta pela ocorrência de SCS do tipo X em mais de 80% das espécies.

**Ctenidae** (40 gêneros e 490 espécies), **Miturgidae** (28 gêneros e 371 espécies) e **Zodaridae** (14 gêneros e 79 espécies)

De acordo com a filogenia proposta por Silva-Dávila (2003), estas famílias fazem parte do grupo das ctenoideas, sendo que Miturgidae e Zodaridae formam um clado que teria como grupo-irmão Ctenidae; entretanto, essa relação é sustentada apenas por um caráter homoplásico e até mesmo a monofilia destas famílias é questionada. Ctenidae, com apenas nove espécies cariotipadas, apresentou número diploide de  $2n=22=20+X1X2$  em *Asthenoctenus borellii* Simon, 1967 (Araujo, 2014) até *Anahita fauna* Karsch, 1879 com  $2n=29=26+X1X2X3$  (Chen, 1999). Em Miturgidae, que possui 14 espécies cariotipadas, de três gêneros, o número diplóide varia enormemente, de  $2n=22$  a  $2n=43$ , com predominância de complementos com 26 cromossomos. Zodaridae possui 12 espécies cariotipadas, com número diploide variando de  $2n=21=20A+XA$  a  $2n=42=40A+X1X2A$

**Psechridae** (2 gêneros e 24 espécies) e **Oxyopidae** (9 gêneros e 422 espécies)

Segundo Silva-Dávila (2003), Psechridae seria grupo-irmão de um clado formado por Oxyopidae+Senoculidae. Todo esse grupo seria irmão das outras verdadeiras licosoideas Trechaleidae(Lycosidae+Pisauridae). Em Psechridae, a única espécie cariotipada apresentou  $2n=24=22+X1X2$ , com cromossomos telocêntricos. Oxyopidae, com 25 espécies cariotipadas de cinco gêneros, mostra número diplóide oscilando entre  $2n=11$  e  $2n=28$ . O  $2n=21$  predomina, ocorrendo em 16 espécies. O SCS mais frequentemente encontrado foi o do tipo X, em mais de 80% dos casos, e o outro sistema observado foi aquele do tipo X1X2. Quanto à morfologia cromossômica, verificou-se a prevalência de cromossomos acro/telocêntricos, com exceção de um cromossomo sexual metacêntrico em uma espécie e dos cromossomos holocêntricos de uma outra espécie.. Oxyopidae é a única família entre todas as aranhas que tem predomínio de espécies com  $2n=21$ .

**Lycosidae** (107 gêneros e 2305 espécies) e **Pisauridae** (54 gêneros e 332 espécies)

Considerando a análise cladística de Silva-Dávila (2003), estas duas famílias formam um clado que teria como grupo-irmão Trechaleidae. Lycosidae ocupa a 4ª posição em termos de número de espécies descritas taxonomicamente e constitui a família mais conhecida citogeneticamente, com estudos em 117 espécies pertencentes a 23 gêneros. O número diplóide oscila entre  $2n=12$  e  $2n=30$ , com predominância de complementos com 28 cromossomos. O SCS do tipo X1X2 foi registrado na maior parte das espécies e os outros sistemas detectados foram do tipo X e X1X2X3. A morfologia cromossômica era quase que exclusivamente acro/telocêntrica em todas as espécies. Pode-se destacar os gêneros *Pirata* Sundevall, 1833 e *Schizocosa* Chamberlin, 1904 que exibiram predominância de espécies com  $2n=26$  e  $2n=22$ , respectivamente, diferindo do  $2n=28$  encontrado na maioria dos representantes da família.

Pisauridae, com 12 espécies cariotipadas de três gêneros, possui número cromossômico variando de  $2n=24$  a  $2n=29$ , também com prevalência de complementos com 28 elementos. Com exceção de uma espécie que mostrou SCS do tipo X1X2X3, todas as outras apresentaram sistema do tipo X1X2. A morfologia cromossômica, quando descrita, era exclusivamente acrocêntrica. Os dados cromossômicos numéricos, morfológicos e de SCS apontam para uma grande similaridade cariotípica entre as espécies de Lycosidae e Pisauridae. Estudos citogenéticos em Trechaleidae revelam-se importantes no sentido de verificar se esses caracteres se aplicariam para todo esse clado.

**Zodariidae** (73 gêneros e 842 espécies)

De posição filogenética incerta, esta família de Entelegynae possui 9 espécies cariotipadas pertencentes a dois gêneros.. Nesta família, o complemento diplóide varia de  $2n=21$  a  $2n=42$ , com seis diferentes números cromossômicos encontrados, revelando uma enorme diversidade cariotípica , considerando-se o pequeno número de representantes estudados. Os SCS encontrados foram dos tipos X e X1X2. A morfologia dos elementos é geralmente acro/telocêntrica. A análise de outros gêneros, como *Tenedos* O.P.- Cambridge, 1897, que ocorre no Brasil, poderia revelar se essa heterogeneidade é somente aparente.

#### **4 - Justificativa:**

As aranhas (Aranae) compõem um grupo ecológico muito importante, e como predadores por essência, elas são responsáveis por ajudar a manter um equilíbrio ecológico na natureza. Sua diversidade de cores e formas se reflete nos seus hábitos alimentares tão diversos quanto esses caracteres, sendo predadoras de besouros, baratas, mariposas, borboletas, formigas, ratos, anfíbios, pássaros e algumas espécies predadoras até mesmo de

outras aranhas. Dentro dos artrópodes elas são predadoras de topo de cadeia, sendo presas quase que exclusivamente de vertebrados, principalmente de algumas espécies de aves e sapos. Além disso, ainda apresentam comportamentos complexos de caça e acasalamento: algumas espécies conseguem avaliar suas chances de sucesso na captura da presa e, até mesmo, mudar a estratégia de captura; outras, para acasalarem, exibem comportamentos de corte tão complexos quanto os das aves. Animais complexos, predadores vorazes e ainda muito pouco estudados (Foelix, 1996).

A ordem Araneae possui aproximadamente 44.540 espécies descritas (Platnick, 2014) e, destas, apenas 771 spp possuem algum dado citogenético, e muitos dados são restritos a apenas descrição de número diploide, existindo poucos dados de bandamento cromossômico.

Os primeiros estudos citogenéticos em aranhas são de Carnoy (1885), Painter (1914); Suzuki & Okada (1950); Mittal (1963) e Pinter & Walters (1971). Até por volta de 1958, os cromossomos eram obtidos através de gônadas, incluídas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina férrica de Heidenhain e isso dificultava a interpretação dos resultados. Surgiu então a técnica do esmagamento, utilizando os corantes carmin-acético ouorceína, empregada por Sharma et al. (1959) e Beçak & Beçak (1960). Em 1971, Pinter & Walters (1971) introduziram o uso da colchicina, que, até hoje, se mostra importante na obtenção de células metafásicas possibilitando a boa visualização dos cromossomos. Em 1974, Brum-Zorrilla & Cazenave passaram a utilizar a fixação com Metanol-Ácido Acético 3:1 e o Giemsa como corante.

Matsumoto (1977) foi o pioneiro na observação de cromossomos provenientes de células embrionárias de aranhas, que mostram-se como um valioso material na obtenção de metáfases mitóticas, pois apresentam um alto índice de divisão celular. Contudo, existe uma gama muito grande de tecidos que tem sido empregada nos estudos citogenéticos em aranhas. Podem-se utilizar gônadas (ovários e testículos), gânglios cerebrais ou, até mesmo, como descrito por Wang & Yan (2001), cultura de células sanguíneas. Atualmente, é empregada uma ampla variedade de técnicas, sendo aquela de suspensão celular a mais utilizada; no entanto, a técnica de esmagamento ainda é usada em alguns casos. Diversos tipos de colorações têm sido utilizados com sucesso, desde a convencional, com Giemsa, até as diferenciais, como a de obtenção de bandas C, impregnação pelo íon prata e fluorocromos base-específicos.

O presente trabalho tem como função gerar dados citogenéticos que permitam estabelecer, de forma mais clara, a relação filogenética entre diferentes espécies de três diferentes famílias de aranhas, com ampla distribuição na região neotropical: Ctenidae, Lycosidae e Sparassidae, que possuem espécies de interesse humano e com grande confusão taxonômica. A citogenética é uma das mais eficazes ferramentas de caracterização de espécies que, isolada, talvez não seja suficiente para definir os limites entre as espécies, mas que estuda e revela suas características essenciais, auxiliando assim na melhor definição das relações filogenéticas e a uma real e eficaz conservação da biodiversidade.

## **5 - Objetivos:**

A citogenética de aranhas é uma ferramenta muito importante para um melhor entendimento da estrutura cromossômica e caracterização de espécies, auxiliando em estudos filogenéticos e taxonômicos, sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos:

- analisar o cariótipo de três diferentes famílias de aranhas, com definição de número diploide e morfologia de cromossomos;
- analisar o comportamento meiótico das espécies analisadas;
- determinar o padrão de distribuição de heterocromatina;
- identificar as regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS);

- identificar regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT;
- determinar a localização do DNAr 18S e 5S

## 6. Procedimentos Metodológicos/Métodos e Técnicas

### Locais de coleta e espécies de estudo

Neste projeto serão analisadas algumas espécies de 3 famílias: Ctenidae, Lycosidae e Sparassidae, que possuem ampla distribuição na região neotropical, sendo alguns gêneros de interesse humano, como o gênero *Phoneutria* (Ctenidae), com espécies venenosas e o gênero *Ctenus*, que é o gênero tipo da família Ctenidae. *Polybetes* é um gênero da família Sparassidae, que possui apenas 8 espécies, sendo que já foi encontrada uma em Londrina ainda não descrita. E as espécies da família Lycosidae estão envolvidas em uma grande confusão taxonômica. Os espécimes serão coletados no campus da Universidade Estadual de Londrina, mata dos Godoy e Parque Estadual de Foz de Iguaçu. Os locais foram escolhidos pela ausência de dados cromossômicos das espécies de aranhas habitantes destes locais e também pela proximidade e facilidade de acesso dos dois primeiros locais. Em Foz do Iguaçu já existem equipes de coleta de insetos, portanto já estamos nos juntando a esse grupo nas coletas. Deve-se informar que já foram realizadas coletas prévias para saber que espécies habitam estas localidades e, a princípio, as espécies analisadas neste projeto serão: *Phoneutria nigriventer*, *Ctenus ornatus* e *Viracucha andicola* da família Ctenidae; *Polybetes pythagoricus* e *Polybetes germaini* da família Sparassidae; *Gladicosa gulosa* e *Lycosa* sp da família Lycosa. O número de exemplares analisados deverá ser em torno de 10 indivíduos (este número pode variar, pois depende das coletas), preferencialmente machos pois as análises meióticas serão realizadas por meio da retirada de testículos.

Os espécimes serão coletados por busca ativa utilizando como material de coleta uma lanterna de cabeça (pois a coleta será noturna, período de maior atividade desses animais), uma pinça de trinta centímetros (utilizada para manusear com segurança os espécimes) e sacos plásticos de 20 cm de comprimento por 15 cm de largura onde os animais serão mantidos, até o momento da retirada das gônadas. O aluno responsável pelas coletas teve um treinamento de coleta de aranhas, realizou cursos e já vem trabalhando com esse grupo no laboratório de Citogenética Animal há cerca de 6 meses, para desenvolvimento do seu trabalho de conclusão de curso (TCC) e Mestrado. Os espécimes serão enviados ao Laboratório de Coleções Especiais Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curador D. M. Barros-Battesti), aos cuidados do Dr. Antônio Domingues Brescovit, onde serão identificadas pelo biólogo João Lucas Chavari, e tombadas no Museu de Zoologia da USP.

As técnicas a serem utilizadas foram descritas abaixo e consistem em:

**Obtenção de cromossomos meióticos e mitóticos**, segundo Araújo et al. (2008): as análises serão feitas em cerca de 10 células por preparação.

- 1- Remover a gônada em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,72g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em 1 litro de água destilada).
- 2- Colocar o material em solução de colchicina a 0,16%, preparada com solução fisiológica para insetos, durante 2 horas, para que ocorra o acúmulo de metáfases.

- 3- Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, deixando agir durante 15 minutos.
- 4- Fixar em Carnoy I (metanol-ácido acético, na proporção de 3:1), durante 60 minutos.
- 5- Colocar porções do material em uma lâmina de vidro, juntamente com uma gota de solução de ácido acético a 60% e, em seguida, com o auxílio de um pequeno bastão de metal, macerá-las até formar uma suspensão celular.
- 6- Gotejar mais algumas gotas de ácido acético a 60% e espalhar o material sobre a lâmina.
- 7- Secar a lâmina em uma placa de metal, à temperatura de 35 a 40° C.

Os embriões, caso disponíveis, serão processados segundo a metodologia apresentada abaixo:

- 1- Remover o embrião do ovo, imerso em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,72g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em 1 litro de água destilada) dentro de uma placa de vidro escavada.
- 2- Retirar o máximo possível do vitelo com o auxílio de alfinete entomológico número 0000 para evitar a ocorrência de impurezas na lâmina, procurando não danificar o embrião.
- 3- Transferir o embrião, utilizando pinças finas ou pipeta Pasteur, para outra escavação da placa contendo solução de colchicina a 0,05% (diluída em solução fisiológica para insetos) e deixar por 2 horas, no intuito de obter um maior número de células em metáfase.
- 4- Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, deixando agir durante 15 minutos.
- 5- Fixar em Carnoy I (metanol-ácido acético, na proporção de 3:1), durante 60 minutos.
- 6- Transferir o embrião para uma lâmina de vidro, juntamente com uma gota de solução de ácido acético a 60% e, em seguida, com o auxílio de um pequeno bastão de metal, macerá-lo até formar uma suspensão celular.
- 7- Gotejar mais algumas gotas de ácido acético a 60% e espalhar o material sobre a lâmina.
- 8- Secar a lâmina em uma placa de metal, à temperatura de 35 a 40° C.6.2.

### **Coloração Convencional (Giemsa)**

Após a obtenção da preparação cromossômica, deixá-la a temperatura ambiente por pelo menos um dia; corar com solução de Giemsa 3%, contendo 47mL de água destilada, 1,5mL de Giemsa (Merck), e 1,5mL de tampão fosfato pH 6,8, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Lavar rapidamente cada lâmina em água de torneira e secar ao ar.

### **Técnica de obtenção de bandas C**

A técnica a ser utilizada será a descrita por Sumner (1972), com algumas modificações sugeridas por Araújo (2007):

- 1- Tratar as lâminas em solução de ácido clorídrico (0.1N), à temperatura ambiente.
- 2- Tratar as preparações cromossômicas com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante 2 a 10 segundos, à temperatura de 30°C.
- 3- Lavar as lâminas, sucessivas vezes com ácido acético em diferentes concentrações.
- 4- Lavar as lâminas várias vezes em água destilada e secar ao ar.
- 6- Lavar as lâminas em tampão 2XSSC (pH 7,3), à temperatura ambiente.
- 7- Incubar as lâminas em tampão 2XSSC (pH 7,3), por 30 minutos, à temperatura de 60°C.
- 8- Lavar as lâminas várias vezes com água destilada e secar ao ar.
- 9- Submeter as lâminas à coloração com solução de Giemsa 3%, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

#### **Técnica de marcação com fluorocromos base-específicos (CMA3/DAPI)**

Será utilizada a técnica, com algumas modificações sugeridas por Araújo (2007), de Schweizer (1980).

- 1- Colocar sobre a lâmina 40µl de cromomicina A3 (CMA3) e cobrir com uma lamínula (a solução de CMA3 já deve estar preparada e estabilizada).
- 2- Deixar a lâmina em temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro, por 1 hora.
- 3- Remover a lamínula com um jato forte de água de torneira.
- 4- Colocar sobre a lâmina 40µl de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cobrir com lamínula.
- 5- Deixar a lâmina em temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro, por 20 minutos.
- 6- Remover a lamínula com um jato forte de água de torneira.
- 7- Incubar as lâminas em uma cubeta envolta por papel alumínio com tampão McIlvine, por 5 minutos e secar um pouco (não usar a mesma cubeta que foi utilizada no item 4 ou 8, ou, caso for utilizar, lavar bem a cubeta e colocar tampão McIlvine novo).
- 8- Pressionar levemente a lâmina em papel filtro para retirar o excesso de glicerol.
- 9- Guardar a lâmina no escuro até analisar.

## **Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-NOR)**

A metodologia utilizada foi a de Howell & Black (1980), com algumas modificações propostas por Araújo (2007), de acordo com o descrito a seguir:

- 1- Colocar sobre a lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1 g de gelatina Merck ou comercial dissolvida em 50 ml de água destilada + 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%.
- 2- Cobrir com lamínula ou com um tecido de nylon e incubar em câmara úmida, durante 4 minutos, à temperatura de 67°C.
- 3- Lavar em água destilada e secar ao ar.

## **Hibridização in situ fluorescente (FISH), metodologia proposta por Araújo (2007):**

- 1- Pipetar 200µL de RNase sobre a lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 1 hora em câmara úmida a 37°C.
- 2- Lavar as lâminas em 3 banhos de 2xSSC por 5 minutos cada.
- 3- Desidratar as preparações em álcool 70%, 90% e 100%, durante 3 minutos cada, e secar as lâminas a temperatura ambiente.
- 4- Denaturar a mistura de hibridização por 10 minutos a 70°C e resfriar em gelo por 5 minutos.
- 5- Adicionar 40µL da mistura de hibridização sobre a lâmina e cobrir com lamínula.
- 6- Colocar as lâminas em câmara úmida a 90°C por 10 minutos.
- 7- Deixar em hibridização na câmara úmida a 37°C overnight.
- 8- Retirar as lamínulas em 2xSSC a temperatura ambiente.
- 9- Lavar as lâminas em dois banhos de formamida 20% em 0,1xSSC por 5 minutos cada a temperatura ambiente.
- 10- Lavar as lâminas 3 vezes em 2xSSC por 3 minutos cada, a temperatura ambiente.
- 11- Colocar as lâminas em 4xSSC/Tween por 5 minutos.
- 12- Pipetar 200µL de BSA sobre a lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 5 minutos.
- 13- Remover a lamínula e retirar o BSA, adicionar 30µL de avidina conjugada com FITC, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida por 1 hora a 37°C.
- 14- Lavar as lâminas em 4xSSC/Tween por 3 vezes, durante 8 minutos cada, em temperatura ambiente.
- 15- Adicionar 200µL de BSA sobre a lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 5 minutos.

- 16- Retirar a lamínula e o BSA e adicionar 30 $\mu$ L de anti-avidina biotinilada, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida por 1 hora a 37°C.
- 17- Lavar as lâminas em 4xSSC/Tween por 3 vezes, durante 8 minutos cada, a 37°C.
- 18- Repetir os passos 12 e 13.
- 19- Lavar as lâminas em 4xSSC/Tween por 3 vezes, durante 8 minutos cada, a 37°C.
- 20- Pipetar 100 $\mu$ L de iodeto de propídio (2,5  $\mu$ g/mL-1) sobre a lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 10 minutos.
- 21- Lavar a lâmina em 4xSSC/Tween para retirar a lamínula e o iodeto de propídio.
- 22- Pipetar 50 $\mu$ L de solução de antifading sobre a lâmina, cobrir com lamínula e retirar o excesso com papel filtro.

### **Análise cariotípica**

As preparações cromossômicas serão analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas serão feitas com o auxílio da lente objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As melhores células meióticas (espermatogonial, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I e II) serão capturadas através da máquina digital Motic. Quando possível, as fotografias dos cromossomos (em célula espermatogonila) serão recortadas e, em seguida, os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica seguirá o proposto por Levan et al. (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços RB, onde RB = braço maior/ braço menor. Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos serão considerados com dois braços cromossômicos.

### **Obtenção e análise do complexo sinaptonêmico**

A metodologia que será utilizada baseia-se naquela descrita por Loidl & Jones (1986), conforme descrito a seguir:

- 1- Dissecar e retirar os testículos e, em um pedaço de Parafilm, macerá-los em solução fisiológica para insetos com o auxílio de uma lâmina de barbear.
- 2- Pipetar três a quatro gotas de lipsol (0,5%) em uma lâmina, previamente revestida com uma película plástica (passar a lâmina em uma solução contendo 100mL de clorofórmio P.A. e 0,7g de plástico "Falcon"), adicionar uma gota do macerado testicular e esperar entre 20 e 40 segundos.
- 3- Colocar 7 a 8 gotas de solução contendo paraformaldeído a 4% e sacarose 0,1M.
- 4- Deixar a lâmina secar durante aproximadamente 24 horas, passá-la rapidamente em água destilada e secar ao ar.

As lâminas contendo os microestendidos celulares serão impregnadas pelo nitrato de prata, de acordo com a técnica já descrita, com substituição da lamínula por um tecido de nylon (Nybold 3XXX-300 ou 68GC-243). A película plástica contendo os

microestendidos será colocada sobre uma telinha de cobre (50 mesh), a qual deverá analisada em um microscópio eletrônico de transmissão.

## **7. Contribuições Esperadas**

A análise dos dados deverá contribuir para uma melhor caracterização citogenética e das relações filogenéticas desse grupo de animais permitindo assim, juntamente com os dados produzidos por análises morfológicas e moleculares, conhecer e estimar qual o real número de espécies para esse clado (Araneae). Atualmente, muito se discute sobre conservação da biodiversidade, mas pouco se sabe sobre seu tamanho e componentes. Assim, é preciso reforçar os estudos taxonômicos e sistemáticos, derivados principalmente de três grandes frentes de estudo: citogenética, genética molecular e morfologia.

## **8. Local de Realização / Orgãos Envolvidos**

Laboratório de Citogenética Animal - Depto de Biologia Geral/CCB-UEL

### 9. Cronograma de Desenvolvimento

| Item | Atividade                                                     | Ano<br>Mês | I   |     |     |       | II  |     |     |       | III |     |     |       |
|------|---------------------------------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-------|
|      |                                                               |            | 1-3 | 4-6 | 7-9 | 10-12 | 1-3 | 4-6 | 7-9 | 10-12 | 1-3 | 4-6 | 7-9 | 10-12 |
| 1    | Coleta dos espécimes                                          |            | X   | X   | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   |     |       |
| 2    | Contagem do número cromossômico                               |            |     | X   | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   |     |       |
| 3    | Análises mitótica e meiótica                                  |            |     | X   | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   |     |       |
| 4    | Análise de bandamento convencional                            |            |     | X   | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   |     |       |
| 5    | Análise após tratamento com fluorocromos                      |            |     |     | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   |     |       |
| 6    | Análise da hibridação <i>in situ</i> com fluorescência (FISH) |            |     |     | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   | X   |       |
| 7    | Análise de complexo sinaptonêmico                             |            |     |     | X   | X     | X   | X   | X   | X     | X   | X   | X   |       |
| 8    | Análise dos resultados e relatório                            |            |     |     |     | X     |     |     |     | X     |     |     | X   | X     |

## 10 – Bibliografia Básica

Araujo D, Cella D M (2007) 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 - Rio Claro 170 páginas.

Araujo D, Rheims CA, Brescovit AD, Cella DM (2008) Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *J Zool Sys Evol Res* 46: 89–95

Araujo D, Oliveira EG, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM (2014) Comparative Cytogenetics of Seven Ctenidae Species (Araneae). *J Zool Sys Evol Res* 31: 83–88

Beçak W, Beçak ML (1960) Constituição cromossômica de duas espécies de aranhas do gênero "*Loxosceles*". *Revista Brasileira de Biologia* 20(4): 425-427.

Bergström J (2003) Arthropod origins. *Bulletin of Geosciences* 78(4): 323-334

Brum-Zorrilla N, Cazenave AM (1974) Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Experientia* 30(1): 94-95.

Carnoy JB (1885) La cytodiérese chez les arthropodes. *La Cellule* 1: 191-440. Chen SH (1999) Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). *Zoological Studies* 38(4): 423-434.

Chen SH (1999) Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). *Zoological Studies* 38(4): 423-434.

Coddington JA, Levi HW (1991) Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 565-592.

Foelix R F, et al. (1996) *Biology of Spiders* 2ed. Oxford University Press USA, 330 páginas.

Griswold CE, Coddington JA, Hormiga G, Scharff N (1998) Phylogeny of the orb-web building spiders (Araneae, Orbiculariae: Deinopoidea, Araneoidea). *Zool. J. Linn. Soc.* 123: 1-99.

Griswold CE, Coddington JA, Platnick NI, Forster RR (1999) Towards a phylogeny of entelegyne spiders (Araneae, Araneomorphae, Entelegynae). *The Journal of Arachnology* 27: 53-63.

Griswold CE, Ramírez MJ, Coddington JA, Platnick NI (2005) Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae) with comments on their phylogeny. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56(2): 1-324.

Hetzler S (1979) Some studies of spider chromosomes. *American Arachnology* 20: 20. Hong W, Ben-Ming R, Xin-Ping W (1992) Chromosome study of the spider *Agelena difficilis*. *Acta Arachnologica Sinica* 1(1): 43-44.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

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

Král, J.; Korinková, T.; Krkavcová, L.; Musilová, J.; Forman, M.; Herrera, I.M.A.; Haddad, C.R.; Vítková, M.; Henriques, S.; Vargas, J.G.P.; Hedin, M. (2013) Evolution of karyotype,

sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 109, n. 2, p. 377 - 408.

Kuntner M (2006) Phylogenetic systematics of the Gondwanan nephilid spider lineage Clitaetrinae (Araneae, Nephilidae). *Zool. Scripta* 35: 19-62.

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

Loidl J, Jones GH (1986) Synaptonemal complex spreading in *Allium*. I. Triploid *A. sphaerocephalon*. *Chromosoma* **93**: 420-428.

Maddison WP, Hedin MC (2003) Jumping spider phylogeny (Araneae: Salticidae). *Invertebrate Systematics* 17: 529-549.

Matsumoto S (1977) An observation of somatic chromosomes from spider embryocells. *Acta Arachnologica* 27: 167-172.

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

Painter TS (1914) Spermatogenesis in spiders. *Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Anatomie und Ontogenie der Tiere* 38: 509-576.

Pinter LJ, Walters DM (1971) Karyological studies I. A study of the chromosome numbers and sex-determining mechanism of three species of the genus *Phidippus* (Aranea: Salticidae, Dendryphantinae). *Cytologia* 36: 183-189.

Platnick NI (2014) The world spider catalogue version 14.5, American Museum of Natural History. online: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>

Platnick NI, Coddington JA, Forster RR, Griswold CE (1991) Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). *Am Mus Novitates* 3016: 1-73.

Ramírez MJ (2000) Respiratory system morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). *The Journal of Arachnology* 28: 149-157.

Scharff N, Coddington JA (1997) A phylogenetic analysis of the orb-weaving spider family Araneidae (Arachnida, Araneae). *Zool. J. Linn. Soc.* 120: 355-434.

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

Sharma GP, Jande SS, Tandon KK (1959) Cytological studies on the Indian spiders IV. Chromosome complement and meiosis in *Selenops radiatus* Latreille (Selenopidae) and *Leucauge decorata* (Blackwall) (Tetragnathidae) with special reference to XXX0-type of male sex determining mechanism. *Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University* 10(1): 73-80.

Shultz J W (1990) Evolutionary Morphology and Phylogeny of Arachnida. *Cladistics* 6: 1-38.

Silva-Dávila D (2003) Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 274: 1-86.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306.

Suzuki S (1950a) Sex determination and karyotypes in spiders. Zoological Magazine 59: 31-32.

Wang Z, Yan HM (2001) Technique of chromosome on spider blood cell. Chinese Journal of Zoology 36: 45-46.

### **PARTICIPANTES**

Nome: Ana Lúcia Dias  
Local de Trabalho: CCB - Depto de Biologia Geral  
Coordenador - Doutor

Nome: Matheus Pires Rincão  
Local de Trabalho: CCB - Depto Biologia Geral  
Colaborador – Pós-Graduando

Nome: Renata da Rosa  
Local de Trabalho: CCB - Depto Biologia Geral  
Colaborador – Doutor

Nome: Lucia Giuliano Caetano  
Local de Trabalho: CCB - Depto Biologia Geral  
Consultor – Doutor