



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ARANHAS CARANGUEJEIRAS
(MYGALOMORPHAE) E HAPLOGINAS BASAIS (ARANEOMORPHAE)**

EMYGDIO DE PAULA NETO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ARANHAS CARANGUEJEIRAS
(MYGALOMORPHAE) E HAPLOGINAS BASAIS (ARANEOMORPHAE)**

EMYGDIO DE PAULA NETO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Doralice Maria Cella
Co-orientadora: Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Rio Claro
Estado de São Paulo, Brasil
Abril de 2013

Dedico esta Dissertação para minha mãe e irmã, Marcia Aparecida Pimentel de Paula e Suzana Pimentel de Paula. Mais uma etapa concluída, graças ao amor de vocês.

Dedico o presente trabalho para a Profa. Dra. Doralice Maria Cella (*in memoriam*), que incentivou e forneceu todas as oportunidades para o desenvolvimento desta Dissertação, desde seu início. Sua carreira foi um modelo de ética e do trabalho passional, como a pesquisa acadêmica sempre deveria ser.

Agradecimentos

À minha amada e estimada mãe e irmã, Marcia Aparecida Pimentel de Paula e Suzana Pimentel de Paula, fornecedoras vitalícias de carinho e compreensão, é reconfortante saber que posso contar com vocês, sempre.

À minha primeira e eterna orientadora Profa. Dra. Doralice Maria Cella (*in memoriam*). Seus ensinamentos de conteúdo acadêmico, bem como aqueles relacionados à minha formação como cidadão já estão sedimentados em meu caráter, e tenho certeza que fazem com que hoje eu seja um aluno muito melhor do que eu era quando graduando.

À minha segunda orientadora, Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider, pela atenção constante e diária, mesmo em situações tão adversas. Tua persistência e ajuda foram fundamentais para a conclusão desta Dissertação e de tudo mais que construímos juntos.

Ao Prof. Dr. Adilson Ariza Zacaro, pela leitura dos relatórios, pelo auxílio na interpretação de alguns resultados, pelos jantares e afins. Obrigado por sempre expor a situação por outro aspecto, mesmo quando isto parece impossível.

Ao Prof. MSc. Leonardo Sousa Carvalho, por toda a colaboração nas coletas dos exemplares de Mygalomorphae obtidos no estado do Piauí.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan, Dr. Antonio Domingos Brescovit, BSc. Felipe dos Santos Paula, Dr. Rafael Prezzi Indicatti, Sylvia Marlene Lucas e MSc. Vanessa Penna-Gonçalves, por todo auxílio prestado quanto à coleta, identificação e tombo dos espécimes do presente trabalho.

Às colegas de “orientação” Amália Torrezan Lopes e Viviane Fagundes de Mattos, pelos cafés, risadas, frustrações com vendedores e todos os outros aspectos que tornaram o dia-a-dia um espaço de agradável convivência.

Aos colegas de Pós-Graduação: Andrea Mendez Araújo, Bruno Rodrigues Sampieri, Edmara Tereza Meira e Nico, Franco Dani Campos Pereira, Rafael Neodini Remedio e Vlamir Bozatto de Oliveira, pelos momentos de descontração diariamente proporcionados.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, Anderson Rodrigues e Gerson Mello Souza, que proporcionaram condições para o bom desenvolvimento dos trabalhos.

Às funcionárias administrativas da Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, Josiele Fernanda Magri e Rosemary D. Oliveira S. Cardoso, pelos serviços prestados quanto às documentações e aspectos burocráticos.

A minha querida namorada Cristiane Sommer Leme, pela paciência, apoio e carinho que recebi e recebo. Sua companhia trouxe outro sentido a tudo.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido através do processo 2010/14193-7.

“Nós habitamos um mundo complexo. Alguns limites são nítidos, e permitem definições claras e distintas. Mas a natureza também inclui situações que não podem ser perfeitamente divididas em duas pilhas inequívocas de “sim” ou “não”.”

(Stephen Jay Gould, 1986)

RESUMO

As espécies de aranhas pertencentes aos grupos Mygalomorphae e Haplogynae (Araneomorphae) exibem uma grande diversidade cariotípica, isto é, $2n=14$ a $2n=110$ e sistemas cromossômicos sexuais (SCS) dos tipos X_0 , XY , X_1X_2O e $X_1X_2X_3X_4O$, nas 19 espécies de migalomorfos analisadas; e $2n=7$ a $2n=40$, e SCS dos tipos X_0 , X_1X_2Y , XY e X_1X_2O , nas 51 espécies de aranhas haploginas estudadas. Nestes grupos, a morfologia meta e submetacêntrica dos cromossomos é predominante. Contudo, os dados citogenéticos em aranhas correspondem a menos de 2% do total de espécies taxonomicamente descritas. Considerando as particularidades cromossômicas encontradas nestes dois grupos, bem como a escassez de informações citogenéticas em representantes que ocorrem no Brasil, o objetivo deste trabalho é caracterizar citogeneticamente, utilizando técnicas de coloração convencional e diferencial (impregnação pelo íon prata, bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos), quatro espécies de aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae, Theraphosidae) e duas espécies de Haplogynae basais (Araneomorphae, Filistatidae), visando estabelecer os mecanismos de evolução cromossômica que podem ter ocorrido nestes grupos. A análise das espécies de Mygalomorphae revelou $2n=63$, XY_1Y_2 para *Guyruita cerrado* e $2n=22$, $X_1Y_1+X_2Y_2$ em *Oligoxystre bolivianum*, *Oligoxystre caatinga* e *Oligoxystre rufoniger*. O uso de colorações diferenciais no estudo de células mitóticas e meióticas foi imprescindível para identificar estes SCS, os quais são inéditos para o grupo bem como para todas as aranhas. Além disso, os números diploides encontrados nestas quatro espécies, nunca haviam sido descritos para as migalomorfos, e o $2n=22$ representa o segundo menor número diploide já descrito para Theraphosidae. A comparação dos dados obtidos, com aqueles de espécies filogeneticamente relacionadas, permitiu inferir que estes SCS provavelmente tiveram origem a partir de sistemas dos tipos X_0 ou X_1X_2O . Estudos cromossômicos nas duas espécies de Filistatidae mostraram $2n=25$, X_1X_2Y e $2n=21$, X_1X_2Y em *Kukulcania hibernalis* e *Misionella mendensis*, respectivamente. Uma diferença quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) foi observada nestas espécies, ou seja, *K. hibernalis* revelou predominância de blocos de HC na região terminal dos cromossomos, enquanto em *M. mendensis*, o padrão da HC foi pericentromérico. No entanto, ambas as espécies apresentaram o mesmo número de pares

cromossômicos portadores de regiões organizadoras de nucléolo. As informações citogenéticas disponíveis para Filistatidae apontam para uma grande diversidade de números diploides, contudo o SCS do tipo X_1X_2Y parece ser conservado. Adicionalmente, a diferenciação cariotípica entre as espécies desta família parece não ter envolvido apenas o número de autossomos, mas também sítios cromossômicos específicos, como as regiões de heterocromatina constitutiva.

Palavras-chaves: Araneae, citogenética, meiose, número diplóide, sistema cromossômico sexual

ABSTRACT

The spider species belonging to the Mygalomorphae and Haplogynae (Araneomorphae) groups exhibit a great karyotype diversity, that is, $2n=14$ to $2n=110$ and sex chromosome systems (SCS) of the X_0 , XY , X_1X_20 and $X_1X_2X_3X_40$ types in the 19 species of mygalomorph analyzed, and $2n=7$ to $2n=40$ and SCS of the X_0 , X_1X_2Y , XY and X_1X_20 types in the 51 haplogyne spiders studied. In these groups, the meta and submetacentric chromosome morphology is predominant. However, the cytogenetic data correspond to less than 2% of the total of species taxonomically described. Considering the chromosomal particularities recorded for these two groups as well as the scarcity of cytogenetic information in representatives from Brazilian fauna, the aim of this work is to characterize cytogenetically, using conventional and differential techniques (silver nitrate impregnation, C-banding and base-specific fluorochrome staining) four species of tarantula spiders (Araneomorphae, Theraphosidae) and two species of basal Haplogynae spiders (Araneomorphae, Filistatidae), with the purpose of establishing the mechanisms of chromosomal evolution that have occurred in these groups. The analyses of Mygalomorphae species revealed $2n=63$, XY_1Y_2 for *Guyruita cerrado* and $2n=22$, $X_1Y_1+X_2Y_2$ in *Oligoxystre bolivianum*, *Oligoxystre caatinga* and *Oligoxystre rufoniger*. In the study of mitotic and meiotic cells, the use of differential staining was indispensable for identifying these SCS, which are original for this group and spiders as a whole. Moreover, the diploid numbers observed in the four species studied here had never been described for the mygalomorphs, and the $2n=22$ corresponds to the second lowest diploid number described for Theraphosidae until now. The comparison of the obtained data with those of phylogenetically related species allowed us to infer that these SCS were probably originated from X_0 or X_1X_20 SCS. Chromosomal studies in both Filistatidae species showed $2n=25$, X_1X_2Y and $2n=21$, X_1X_2Y in *Kukulcania hibernalis* and *Misionella mendensis*, respectively. A difference regarding to the distribution of constitutive heterochromatin (CH) was observed in these species, i.e., *K. hibernalis* revealed a predominance of CH blocks in the terminal regions of chromosomes, while in *M. mendensis*, the pattern of CH was pericentromeric. Nevertheless, both species presented the same number of chromosomal pairs carrier of nucleolar organizer regions. The cytogenetic information available for Filistatidae point to a great diversity of diploid numbers, but

the SCS of X_1X_2Y type seems to be conserved. Furthermore, the karyotype differentiation between the species of this family seems to have not involved only the number of autosomal pairs, but also specific chromosomal sites, such as the constitutive heterochromatic regions.

Key words: Araneae, cytogenetic, diploid number, meiosis, sex chromosome system

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. MATERIAL.....	21
3.2. MÉTODOS.....	21
3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas.....	21
3.2.2. Coloração convencional (Giemsa).....	21
3.2.3. Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON).....	22
3.2.4. Técnica de obtenção das bandas C.....	22
3.2.5. Técnica de marcação com fluorocromos base-específicos (CMA ₃ /DAPI).....	23
3.2.6. Colorações associadas.....	23
3.2.7. Análises cromossômicas em microscopia de luz.....	24
4. RESULTADOS.....	25
Artigo I	
O primeiro registro dos sistemas cromossômicos sexuais dos tipos XY₁Y₂ e X₁Y₁+X₂Y₂ em aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae, Theraphosidae)	
Resumo.....	28
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	47
Referências Bibliográficas.....	55
Artigo II	
Análise citogenética comparativa entre espécies da família Filistatidae (Araneomorphae, Haplogynae)	
Resumo.....	61
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Resultados.....	65
Discussão.....	75
Referências Bibliográficas.....	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ordem Araneae constitui uma das mais amplas dentro da classe Arachnida, pois inclui cerca de 43.500 espécies descritas taxonomicamente. Esta ordem compreende duas subordens (CODDINGTON & LEVI, 1991; PLATNICK, 2013):

- Mesothelae, com uma única família, Liphistiidae, contendo três gêneros e aproximadamente 90 espécies, as quais ocorrem principalmente na Região Paleártica e Oriental;
- Opisthothelae, a qual é composta por duas infraordens: Mygalomorphae, com 16 famílias, incluindo aproximadamente 320 gêneros e 2.730 espécies, sendo que a maioria destas é da Região Neotropical, Paleotropical (Etiópica e Oriental) e Australiana; e Araneomorphae, com 95 famílias, possuindo cerca de 3.500 gêneros e 41.000 espécies, cujos representantes ocorrem em quase todas as regiões biogeográficas. A infraordem Araneomorphae inclui as famílias Hypochilidae, Gradungulidae, Austrochilidae, bem como aquelas dos clados Haplogynae (com 25 famílias e 4.479 espécies) e Entelegynae (com 67 famílias e 36.378 representantes).

Análises filogenéticas realizadas com base em caracteres morfológicos (CODDINGTON & LEVI, 1991; PLATNICK *et al.*, 1991) mostraram que as espécies de Mesothelae ocupam posição basal em relação aquelas de Mygalomorphae e Araneomorphae (Figura 1). Além disso, estas análises também propuseram que as infraordens Mygalomorphae e Araneomorphae constituem grupos irmãos. Relações filogenéticas em Araneomorphae (Figura 2) demonstraram que Hypochilidae, Gradungulidae e Austrochilidae representam as Araneomorphae basais e Haplogynae e Entelegynae são grupos irmãos. Entre as aranhas do clado

Haplogynae, Filistatidae é considerada basal em relação a todas as outras famílias deste grupo.

Os dados citogenéticos sobre Araneae existentes na literatura mostram que somente cerca de dois por cento das espécies conhecidas taxonomicamente têm cariótipos caracterizados quanto ao número diploide, morfologia cromossômica e tipo de sistema cromossômico sexual (ARAUJO *et al.*, 2012).

Em Mesothelae, apenas uma espécie de Liphistiidae foi estudada do ponto de vista citogenético, *Heptathela kimurai*, que exibiu $2n=\pm 96=94+X_1X_20$ e uma predominância de cromossomos acrocêntricos (SUZUKI, 1954).

Na infraordem Mygalomorphae, 19 espécies pertencentes a seis famílias tiveram seus cromossomos caracterizados (Figura 1); neste grupo, o número diploide variou de $2n=14$ (XY) a $2n=110$ ($X_1X_2X_3X_40$), os tipos de sistema cromossômico sexual encontrados nos machos foram $X0$, XY, X_1X_20 e $X_1X_2X_3X_40$, e a morfologia dos cromossomos foi meta/submetacêntrica ou subtelo/acrocêntrica (ARAUJO *et al.*, 2013). Levando-se em conta que número cromossômico alto está presente em Mesothelae e é predominante em espécies de Mygalomorphae, alguns autores sugeriram que o principal mecanismo de diferenciação cariotípica das aranhas foi através da redução do número diploide (SUZUKI, 1954; KRÁL *et al.*, 2006). Contudo, a presença de número diploide baixo, $2n=14$ (XY) e $2n=16$ (AKAN *et al.*, 2005; REZAC *et al.*, 2006), em espécies pertencentes a famílias distintas de Mygalomorphae, indica que estudos citogenéticos adicionais devem ser realizados nesses táxons, visando estabelecer as características cariotípicas plesiomórficas para as aranhas e compreender os mecanismos de evolução cromossômica que tem ocorrido nos clados basais e derivados filogeneticamente de Araneae.

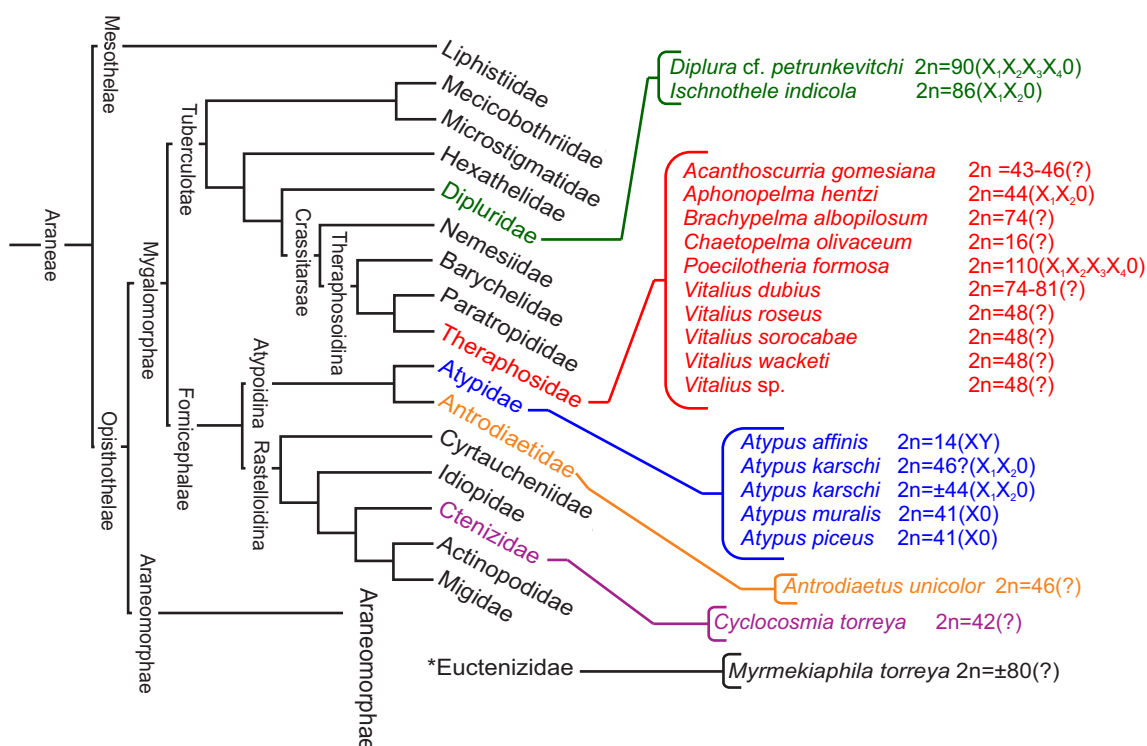


Figura 1 – Filogenia proposta para Araneae com base em caracteres morfológicos (CODDINGTON & LEVI, 1991) e informações citogenéticas para os representantes de Mygalomorphae (ARAUJO et al., 2013). *A família Euctenizidae foi reconhecida apenas recentemente, de acordo com BOND et al. (2012).

Em Araneomorphae, particularmente nos grupos basais (Figura 2), existem dados citogenéticos para apenas uma espécie de Hypochilidae, *Hypochilus pococki* – $2n=29$ (X_1X_2Y), e um representante de Austrochilidae, *Austrochilus* sp. – $2n=38$ (XY). O pequeno número de espécies incluídas nessas famílias, 12 e nove, respectivamente, e a distribuição geográfica restrita - Hypochilidae nos EUA e China, e Austrochilidae na Argentina e Chile (KRÁL *et al.*, 2006; PLATNICK, 2013) - certamente tem dificultado os estudos cromossômicos nesses grupos.

As aranhas Haplogynae possuem 53 espécies, incluídas em 12 famílias, investigadas sob o ponto de vista citogenético (Figura 2), as quais exibiram número diploide variando entre $2n=7$ (X_0) a $2n=40$ (?), e cromossomos com morfologia predominantemente meta/submetacêntrica, com exceção dos representantes das famílias Dysderidae e Segestriidae, que exibiram cromossomos holocêntricos (KRÁL *et al.*, 2006, 2010; ARAUJO *et al.*, 2013). Os sistemas cromossômicos sexuais já registrados nesse clado foram do tipo X_0 em 53% das espécies, X_1X_20 em 23%, X_1X_2Y em 17% e XY em 7% dos representantes.

Entelegynae, a linhagem mais diversificada da infraordem Araneomorphae, retém a vasta maioria das informações cromossômicas das aranhas, cerca 590 espécies descritas (ARAUJO *et al.*, 2013), com número diploide variando entre $2n=7$ (X_0) (SUZUKI, 1954) a $2n=52$ (X_1X_20) (WALLACE, 1909). Em contraste com o observado nas espécies do grupo-irmão Haplogynae, as enteleginas exibem uma predominância do sistema cromossômico sexual do tipo X_1X_20 e cromossomos com morfologia acro/telocêntrica. Embora em Entelegynae ocorra uma grande amplitude de variação do número cromossômico, KRÁL *et al.* (2006) sugeriram que o cariótipo $2n=42$ (X_1X_20), com cromossomos acrocêntricos, poderia ser representativo de um estado ancestral para as aranhas desse grupo. Essa hipótese foi baseada no fato

que a fórmula cariotípica acima mencionada está presente em diversas famílias não relacionadas, bem como em clados basais de Entelegynae. No entanto, análises citogenéticas adicionais, utilizando técnicas de coloração cromossômica convencional e diferencial, precisam ser realizadas para confirmar essa hipótese e entender os processos de evolução cromossômica que têm ocorrido nas Entelegynae.

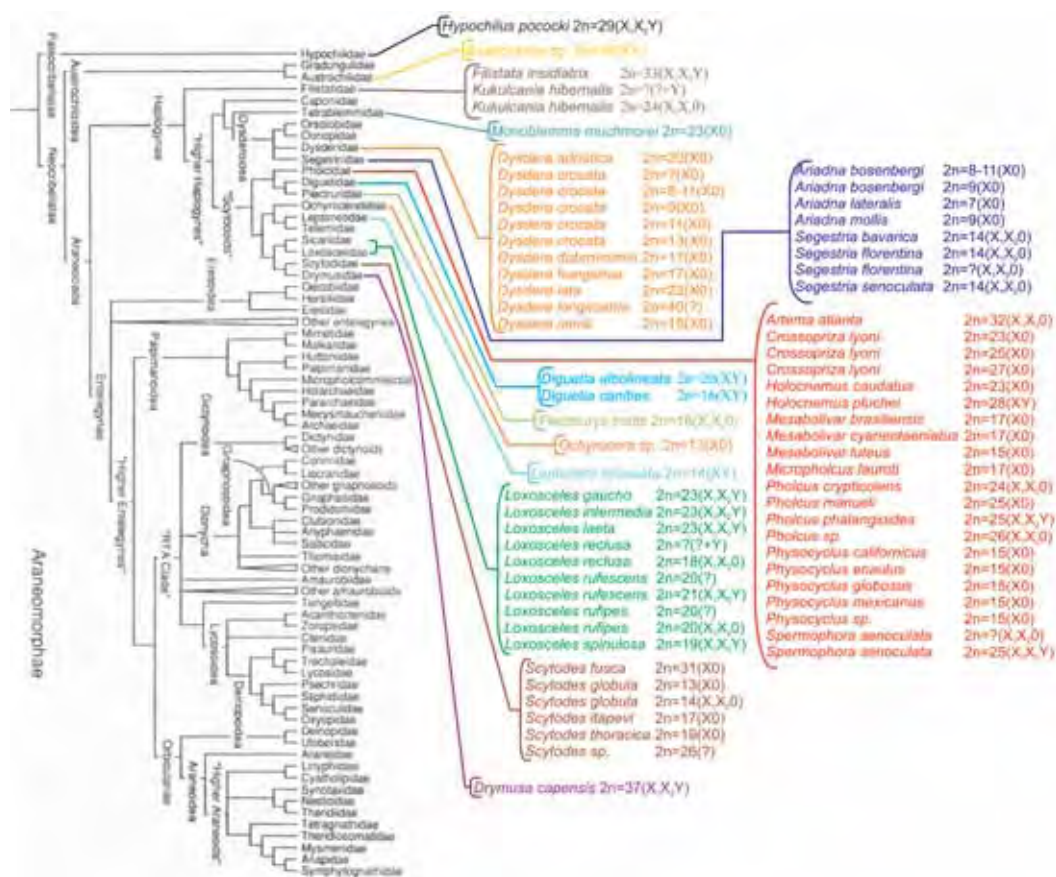


Figura 2 – Relações filogenéticas na subordem Araneomorphae proposta por CODDINGTON & LEVI (1991) e PLATNICK *et al.* (1991), com base em caracteres morfológicos, e informações citogenéticas das espécies de Araneomorphae basais e Haplogynae (ARAUJO *et al.*, 2013).

Levando-se em conta que o sistema cromossômico sexual do tipo X_1X_20 é o mais frequente entre as espécies de Araneae e foi encontrado nas aranhas Mesothelae e Mygalomorphae, as quais são menos derivadas sob o ponto de vista morfológico, e na maioria das Araneomorphae mais derivadas (PAINTER, 1914; SUZUKI, 1951; WHITE, 1977; POSTIGLIONI & BRUM-ZORRILLA, 1981; MADDISON, 1982; ROWELL, 1985, 1990; DATTA & CHATTERJEE, 1988), SUZUKI (1954) sugeriu que esse sistema poderia ser representativo da condição ancestral para todo o grupo. Assim, os demais tipos de sistemas cromossômicos sexuais seriam resultantes de alterações evolutivas independentes, a partir da condição X_1X_20 . A diversificação cariotípica nas aranhas parece ter ocorrido de forma independente nas diferentes famílias, porém as estratégias evolutivas provavelmente foram semelhantes, visto que os mesmos tipos de rearranjos cromossômicos tem sido os responsáveis pela origem de diferentes números diploides encontrados entre os grupos.

Com relação às espécies de aranhas que ocorrem na Região Neotropical, aproximadamente 45 representantes foram estudados citogeneticamente (ARAUJO *et al.*, 2013). A região Neotropical tem uma fauna de aranhas particularmente muito numerosa e diversificada, com 1.090 gêneros em 83 famílias (CODDINGTON & LEVI, 1991), representando aproximadamente um terço de todos os gêneros conhecidos taxonomicamente e, provavelmente, incluindo espécies endêmicas do Neotrópico e outras que têm uma distribuição mundial ou são compartilhadas com o Continente Africano e com a Austrália. Embora a fauna Neotropical seja derivada dos trópicos do Velho Mundo, pois, segundo os registros fósseis, as aranhas surgiram na era Paleozóica, no Neo-Siluriano ou no Eodevoniano (CODDINGTON & LEVI, 1991), ou seja, antes da deriva dos continentes (era Mesozóica), alguns dos

mais primitivos gêneros viventes devem ainda permanecer como elementos da biota das aranhas Neotropicais, os quais devem diferir marcadamente daqueles do Hemisfério Norte, devido ao longo período de isolamento do Continente Sul. Assim, análises cromossômicas em aranhas da região Neotropical podem ser de grande importância para entender os processos de evolução cariotípica que teriam ocorrido neste grupo como um todo.

2. OBJETIVOS

Considerando as particularidades cromossômicas encontradas em Araneae, (diversidade de número diploide, presença de tipos diferentes de sistemas cromossômicos sexuais, cromossomos com morfologias distintas), bem como a escassez de informações citogenéticas em representantes que ocorrem no Brasil, utilizando técnicas de coloração convencional e diferencial, o objetivo deste trabalho é caracterizar citogeneticamente quatro espécies de aranhas Mygalomorphae (Theraphosidae), *Guyruita cerrado*, *Oligoxystre bolivianum*, *Oligoxystre caatinga* e *Oligoxystre rufoniger*, e duas espécies de Araneomorphae basais (Filistatidae), *Kukulkania hibernalis* e *Misionella mendensis*, visando estabelecer os mecanismos de evolução cromossômica que podem ter ocorrido nestes grupos. Para realizar tal caracterização cromossômica, foram determinados:

- número diploide e haploide de cromossomos, o tipo de sistema cromossômico sexual, morfologia dos cromossomos, comportamento dos cromossomos durante a meiose quanto à heteropiconose, emparelhamento, número e localização de quiasmas, associação e configuração dos cromossomos sexuais e segregação anafásica;
- o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e das regiões de cromatina ricas em sequências de base GC e AT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O número de exemplares adultos e embriões das seis espécies de aranhas analisadas neste trabalho e seus respectivos locais de coleta no Brasil, são mencionados na Tabela 1. A identificação taxonômica dos exemplares de Mygalomorphae foi realizada pela pesquisadora Sylvia Marlene Lucas, e dos espécimes de Araneomorphae pelo Dr. Antonio Domingos Brescovit, ambos do Instituto Butantan, São Paulo, SP. Os exemplares foram depositados na coleção do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP, curadora Darci Barros-Battesti) e na Coleção de História Natural, da Universidade Federal do Piauí, Floriano, Piauí (CHNUFPI, curador Leonardo Sousa Carvalho).

Tabela 1 - Espécies de aranhas analisadas citogeneticamente neste trabalho, com seus respectivos números de indivíduos e locais de coleta.

Espécie	Número de indivíduos	Local de coleta
Mygalomorphae, Theraphosidae		
<i>Guyrulta cerrado</i> Guadanucci et al., 2007	3♂	Floresta Nacional de Palmares (05°03'S, 42°35'W), Altos, Piauí
<i>Oligoxystre bolivianum</i> (Vol, 2001)	1♂	Parque Nacional Serra da Capivara (08°26'S, 42°45'W), São Raimundo Nonato, Piauí
<i>Oligoxystre caatinga</i> Guadanucci, 2007	2♂	Parque Nacional de Sete Cidades (04°05'S, 041°43'W), Brasileira e Piracuruca, Piauí
<i>Oligoxystre rufoniger</i> Guadanucci, 2007	1♂	Parque Nacional Serra da Capivara (08°26'S, 42°45'W), São Raimundo Nonato, Piauí
Araneomorphae, Filistatidae		
<i>Kukulkania hibernalis</i> (Hentz, 1842)	8♂, 4♀	Barra do Jacaré (23°06'S, 50°10'W), Paraná
<i>Misionella mendensis</i> (Mello-Leitão, 1920)	3♂, 4 embriões (3♂, 1♀)	Rio Claro (22°24'S, 47°33'W), São Paulo São Paulo (23°32'S, 46°38'W), São Paulo

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações citológicas para estudo dos cromossomos mitóticos e/ou meióticos, em microscopia de luz, foram obtidas de testículos e ovários de indivíduos adultos, e de alguns embriões, de acordo com a metodologia descrita a seguir: a) Dissecar o animal, ou ovos, em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na_2HPO_4 , 2,72g de KH_2PO_4 , em 1 litro de água destilada), retirar as gônadas ou os embriões, e colocá-los em uma placa escavada, contendo solução de colchicina a 0,16%, preparada com solução fisiológica para insetos, durante 2 horas, para que ocorra o acúmulo de metáfases; b) Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, deixando agir durante 15 minutos; c) Transferir o material para uma placa escavada, contendo fixador Carnoy I (metanol e ácido acético – 3:1) e deixar durante 30 minutos, no mínimo; d) Macerar parte do material, sobre uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 45% ou 60%; e) Secar a lâmina em uma placa de metal à temperatura de 35 a 40°C.

3.2.2. Coloração convencional (Giemsa)

Após a obtenção das preparações cromossômicas, deixar as lâminas à temperatura ambiente por pelo menos um dia e, posteriormente: a) Corar a lâmina em solução de Giemsa a 3% (47 mL de água destilada, 1,5 mL de solução comercial de Giemsa e 1,5 mL de tampão fosfato pH 6,8) durante 12 minutos; b) Lavar rapidamente a lâmina em água destilada e secar ao ar.

3.2.3. Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON)

A metodologia utilizada para a detecção das RONS ativas foi aquela de HOWELL & BLACK (1980), com algumas modificações, de acordo com o descrito a seguir: a) Hidrolisar as lâminas em solução de ácido clorídrico 0,1N à temperatura ambiente, por cinco minutos; b) Colocar sobre a lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1 g de gelatina Sigma dissolvida em 50 mL de água destilada, 0,5 mL de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%; c) Cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida, durante aproximadamente quatro minutos, à temperatura de 67°C; d) Lavar em água destilada e secar ao ar.

3.2.4. Técnica de obtenção das bandas C

As regiões de heterocromatina constitutiva foram identificadas através da técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações: a) Hidrolisar as lâminas em solução de ácido clorídrico 0,1N à temperatura ambiente, por cinco minutos; b) Tratar as preparações cromossômicas com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante aproximadamente cinco segundos, à temperatura de 60°C; c) Lavar as lâminas, duas vezes, em solução de ácido clorídrico 0,1N, à temperatura ambiente; d) Lavar as lâminas em solução 2xSSC (17,5 g de NaCl, 8,8 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, completar para 1000mL de água Mili-Q e ajustar o pH para 7,0), à temperatura ambiente; e) Incubar as lâminas em solução 2xSSC, por 30 minutos, à temperatura de 60°C; f) Lavar as lâminas várias vezes com água destilada e secar ao ar; g) Adicionar 20 µL de solução de DAPI/Vectashield sobre as lâminas e cobrir com lamínula.

3.2.5. Técnica de marcação com fluorocromos base-específicos (CMA₃/DAPI)

Para identificação das regiões da cromatina ricas em sequências de bases AT e GC, foi utilizada a metodologia descrita por CHRISTIAN *et al.* (1998), com algumas modificações: a) Incubar a lâmina em solução de formamida à 70%, diluída em 2xSSC, à 70°C por cerca de dois minutos; b) Lavar as lâminas em dois banhos de 2xSSC, à temperatura ambiente, por dois minutos cada; c) Desidratar a lâmina em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%), por dois minutos cada; d) Secar a lâmina à temperatura ambiente; e) Adicionar 80 µL de CMA₃ (20 µg/mL em MgCl₂ a 32 mM) sobre a lâmina e cobrir com lamínula; f) Deixar a lâmina em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos; g) Retirar a lamínula e lavar as lâminas três vezes em 1xPBS (7,58 g de NaCl, 0,993 g de Na₂HPO₄, 0,414g de NaH₂PO₄, completar para o volume de 1000mL com água Mili-Q) à temperatura ambiente, por 2 minutos cada; h) Adicionar sobre a lâmina 20 µL de DAPI/Vectashield e cobrir com lamínula; i) Aguardar alguns minutos, retirar o excesso de líquido com papel filtro e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

3.2.6. Colorações associadas

a) Seguir o procedimento de coloração convencional (Giemsa). Depois da análise e registro fotográfico das células, lavar a lâmina várias vezes em xilol e secar ao ar; b) Submeter à lâmina à técnica de impregnação pelo íon prata ou à técnica de obtenção de bandas C.

3.2.7. Análises cromossômicas em microscopia de luz

As análises dos cromossomos corados convencionalmente ou submetidos às técnicas de coloração diferencial foram realizadas em microscopia de luz. As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em um fotomicroscópio Olympus BX51, com objetiva 100 de imersão, optovar 1,25 utilizando o software DP Controller. As células submetidas ao bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos foram fotografadas com os filtros específicos para os fluorocromos DAPI (360-390nm) e CMA₃ (430-480nm). As medidas cromossômicas, utilizadas para a determinação da morfologia, foram realizadas através do *plugin* LEVAN, desenvolvido por SAKAMOTO & ZACARO (2009); a classificação morfológica dos cromossomos foi feita de acordo com a nomenclatura proposta de LEVAN *et al.* (1964).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos através do estudo citogenético de seis espécies de aranhas foram organizados em dois artigos científicos, mencionados a seguir:

Artigo I - O primeiro registro dos sistemas cromossômicos sexuais dos tipos XY_1Y_2 e $X_1Y_1+X_2Y_2$ em aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae, Theraphosidae)

Artigo II – Análise citogenética comparativa entre espécies da família Filistatidae (Araneomorphae, Haplogynae)

ARTIGO I

O primeiro registro dos sistemas cromossômicos sexuais dos tipos XY_1Y_2 e $X_1Y_1+X_2Y_2$ em aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae, Theraphosidae)

Emygdio de Paula Neto^{1*}; Marielle Cristina Schneider^{2*}; Felipe dos Santos Paula³; Rafael Prezzi Indicatti³; Sylvia Marlene Lucas³; Leonardo Sousa Carvalho⁴; Doralice Maria Cella¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, SP, Brasil, E-mail: emygdiopn@hotmail.com

²Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Ciências Biológicas, Diadema, SP, Brasil, E-mail: marielle.unifesp@gmail.com

³Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, E-mail: felipedossantospaula@yahoo.com.br; indicatti@gmail.com; sylvialucas@butantan.gov.br

⁴Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Amílcar Ferreira Sobral, Floriano, PI, Brasil, E-mail: leosc_flu@yahoo.com.br

*Autores correspondentes: emygdiopn@hotmail.com, marielle.unifesp@gmail.com

RESUMO

Os dados citogenéticos de aranhas migalomorfas descritos até o presente momento têm mostrado uma intrigante variação no número diplóide que foi de $2n=14$ a $2n=110$, e nos sistemas cromossômicos sexuais (SCS) que foram dos tipos X_0 , X_1X_2 , $X_1X_2X_3X_4$, XY nos machos. Contudo, estes dados referem-se a um número restrito de espécies, considerando que somente 19 representantes de migalomorfas foram citogeneticamente analisadas, de um total de cerca de 2.730 espécies taxonomicamente descritas. Quando as informações cariotípicas do grupo basal Mygalomorphae são comparadas com aquelas de Entelegynae, um grupo derivado das aranhas com número diplóide variando de $2n=10$ a $2n=\pm 52$ e SCS dos tipos X_1X_2 , X_0 , $X_1X_2X_3$, $X_1X_2X_3X_4$, XY , $X_1X_2X_3Y$, $X_1X_2X_3X_4X_5Y$, e X_nY_n , as características cromossômicas plesiomórficas das aranhas não podem ser claramente estabelecidos. Com o objetivo de adicionar informações citogenéticas para tentar estabelecer alguns mecanismos de evolução cariotípica em Mygalomorphae, o presente trabalho descreve algumas características cromossômicas mitóticas e meióticas de quatro espécies de migalomorfas pertencentes à família Theraphosidae: *Guyruita cerrado*, *Oligoxystre bolivianum*, *Oligoxystre caatinga* e *Oligoxystre rufoniger*, todas pertencentes à fauna brasileira. *Guyruita cerrado* apresentou $2n\sigma=63=60+XY_1Y_2$ em metáfases mitóticas. Espermátócitos diplotênicos mostraram 30 bivalentes típicos mais um trivalente incomum, cujos elementos mostraram associação linear e dois quiasmas intersticiais. *Oligoxystre bolivianum*, *O. caatinga* e *O. rufoniger* mostraram $2n\sigma=22=18+X_1Y_1+X_2Y_2$. Células em diplóteno exibiram nove bivalentes regulares, além de dois bivalentes que se localizavam próximos entre si, porém sem associação. Estes dois últimos bivalentes exibiram regiões com graus de

condensação distintos em relação aos elementos do complemento autossômico, sendo identificados como os bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 . A identificação dos SCS do tipo XY_1Y_2 e $X_1Y_1+X_2Y_2$, ainda não registrados para as espécies de aranhas analisadas do ponto de vista citogenético, somente foi possível através da inspeção das células meióticas submetidas a diferentes tipos de coloração que revelaram regiões cromossômicas específicas. Considerando os resultados obtidos, interpretações hipotéticas sobre os mecanismos de origem destes tipos de SCS foram formuladas. Sistemas cromossômicos sexuais não usuais em Mygalomorphae denotam uma evolução cariotípica independente em grupos basais de Araneae.

Palavras-chave: bivalente sexual, cariótipo, citogenética, meiose, trivalente sexual

INTRODUÇÃO

Uma visão amplamente aceita sobre a evolução dos cromossomos sexuais é que sua origem ocorreu a partir de um par de cromossomos autossômicos. A diferenciação dos cromossomos sexuais em elementos heteromórficos envolve o bloqueio da recombinação gênica durante a meiose nas regiões cromossômicas em que há acúmulo de genes com funções determinantes do sexo. Em diferentes grupos de organismos, a evolução dos cromossomos sexuais parece ter ocorrido de forma independente, considerando que espécies filogeneticamente mais derivadas possuem cromossomos sexuais heteromórficos enquanto que espécies basais apresentam cariótipos idênticos em ambos os sexos, sem cromossomos sexuais diferenciados (Traut et al., 1999; Sumner, 2003, Bressa et al., 2009). Adicionalmente, em alguns grupos existe uma grande diversidade de sistemas cromossômicos sexuais cuja origem pode ter ocorrido repetidas vezes e não pode ser facilmente explicada somente a partir do sistema que é encontrado com maior frequência ou que está presente nas espécies basais.

As aranhas são organismos particularmente interessantes para desenvolver estudos sobre evolução dos cromossomos sexuais, pois além da grande diversidade de tipos de sistemas, este parece ser o único grupo no qual há uma predominância do sistema cromossômico sexual (SCS) múltiplo do tipo X_1X_20 (Král et al., 2011). Este tipo de sistema tem sido considerado como uma característica ancestral para as aranhas, uma vez que foi registrado em espécies pertencentes a táxons filogeneticamente basais e derivados (Suzuki, 1954). Embora a própria origem do sistema cromossômico sexual X_1X_20 ainda não tenha sido elucidada para as aranhas, diversos autores têm demonstrado que rearranjos envolvendo apenas os cromossomos sexuais X_1 e X_2 ou estes cromossomos sexuais e autossomos foram

responsáveis pela diferenciação de outros tipos de sistemas simples ou múltiplos encontrados nas espécies deste grupo, como, por exemplo, X_0 , $X_1X_2X_3X_0$, $X_1X_2X_3X_4X_0$, X_1X_2Y , $X_1X_2X_3Y$, $X_1X_2X_3X_4Y$, X_nY_n (para revisão ver Araujo et al., 2012). No entanto, o aumento dos estudos citogenéticos em aranhas, principalmente naquelas pertencentes à clados basais de Araneomorphae, tem revelado que alguns tipos de SCS não foram originados diretamente a partir do sistema $X_1X_2X_0$, mas de outros sistemas derivados, como é o caso da origem do sistema X_0 a partir do sistema XY e do sistema XY a partir do sistema X_1X_2Y (Král et al., 2006).

Segundo Platnick (2013), a ordem Araneae possui 43.678 espécies, as quais estão agrupadas em 112 famílias e distribuídas em três grandes grupos, Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae. Os estudos citogenéticos foram realizados em apenas 676 espécies de aranhas (Araujo et al., 2012, 2013), sendo a maioria destes (cerca de 600) restritos as aranhas Entelegynae, uma linhagem considerada derivada dentro de Araneomorphae (Coddington & Levi, 1991).

A infraordem Mygalomorphae engloba 2.731 espécies, distribuídas em 329 gêneros e 16 famílias (Platnick, 2013). Citogeneticamente, somente 19 espécies de migalomorfas, pertencentes a seis famílias, foram examinadas (Araujo et al., 2013). A família Atypidae, com apenas quatro representantes estudados, mostrou $2n=14$, o menor número diplóide já encontrado em Mygalomorphae, $2n=41$, $2n=\pm 44$, e $2n=\pm 46$ (Suzuki, 1949, 1950, 1954; Řežáč et al., 2006; Král et al., 2011). Além disso, nas espécies desta família foram observados três tipos de SCS, X_0 , $X_1X_2X_0$ e XY ; vale a pena ressaltar que este é o único registro de sistema sexual que inclui um cromossomo sexual Y para aranhas desta infraordem (Řežáč et al., 2006). A família Theraphosidae, com 10 representantes analisados, mostrou a maior variabilidade de número diplóide, incluindo espécies com $2n=16$, $2n=43-46$, $2n=44$, $2n=48$, $2n=74$,

2n=74-81, e 2n=110 (Painter, 1914; Akan et al., 2005; Vítková et al., 2005; Král et al., 2011); no entanto, em apenas duas espécies existem informações sobre o SCS, os quais foram dos tipos X_1X_20 e $X_1X_2X_3X_40$ (Painter, 1914; Král et al., 2011). Em Dipluridae, somente duas espécies foram investigadas, as quais mostraram números diplóides altos, ou seja, 2n=86, X_1X_20 e 2n=90, $X_1X_2X_3X_40$ (Srivastava & Shukla, 1986; Král et al., 2011). As famílias Antrodiaetidae, Ctenizidae e Euctenizidae possuem apenas um representante estudado, que exibiram 2n=46, 2n=42 e 2n=±44, respectivamente (Hetzler, 1979). Nas espécies destas três últimas famílias, dados sobre os tipos de SCS não foram determinados.

Com o objetivo de adicionar informações sobre as características cariotípicas em espécies de aranhas pertencentes a grupo basais, as quais podem contribuir para o entendimento da evolução cariotípica no grupo, quatro espécies de Theraphosidae da fauna brasileira foram analisadas, através de técnicas de coloração convencional e diferencial.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro espécies de Mygalomorphae, todas pertencentes à família Theraphosidae, foram analisadas citogeneticamente. As espécies estudadas com seus respectivos número de indivíduos e localidades de coleta foram mencionados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de Theraphosidae com seus respectivos números de indivíduos citogeneticamente analisados e locais de coleta no estado do Piauí, Brasil.

Espécie	Número de indivíduos	Localidade
<i>Guyruita cerrado</i>	3♂	Floresta Nacional de Palmares (05°03'S 42°35'W), Altos
<i>Oligoxystre bolivianum</i>	1♂	Parque Nacional Serra da Capivara (08°26'S 42°45'W), São Raimundo Nonato
<i>Oligoxystre caatinga</i>	2♂	Parque Nacional de Sete Cidades (04°05'S 041°43'W), Brasileira e Piracuruca
<i>Oligoxystre rufoniger</i>	1♂	Parque Nacional Serra da Capivara (08°26'S 42°45'W), São Raimundo Nonato

O baixo número de indivíduos estudados é decorrente de algumas limitações que estão mencionadas abaixo:

- Local de coleta é de difícil acesso;
- Distribuição das espécies é restrita ao bioma Caatinga;
- Período de ocorrência destas espécies é restrito a determinada estação do ano, especificamente no Verão;
- Baixa ocorrência no campo;
- Durante a coleta, é difícil determinar o estágio de desenvolvimento dos indivíduos, ou seja, se estes são subadultos sem ter iniciado a produção de gônias, adultos em fase de produção de espermatogonias e espermatócitos, ou se são indivíduos velhos com gônadas em degeneração;
- Dificil manutenção dos indivíduos em laboratório até atingir o estágio de diferenciação e ativação das gônadas.

As preparações cromossômicas foram obtidas de gônadas de indivíduos machos jovens e adultos, de acordo com a técnica empregada por Araujo et al. (2005). Todas as preparações foram convencionalmente coradas com solução de Giemsa a 3%. Estas preparações foram sequencialmente submetidas a técnicas específicas para revelar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (técnica de obtenção de bandas C e coloração com fluorocromos base-específicos) e das regiões organizadoras de nucléolo (RONs - impregnação pelo íon prata). A técnica de banda C empregada foi aquela descrita por Sumner (1972), sendo os cromossomos posteriormente corados com 4'-6-dimidino-2-fenilindol (DAPI). A coloração com fluorocromos base-específicos DAPI, para revelar regiões ricas em sequências de bases AT, e Cromomicina A₃ (CMA₃), para detectar regiões ricas em sequências de bases GC, foi aquela estabelecida por Christian et al. (1998). A

impregnação pelo íon prata seguiu o procedimento de Howell & Black (1980). Os registros das células mitóticas e meióticas foram efetuados em um fotomicroscópio Olympus BX51, utilizando o software DP Controller. A classificação morfológica dos cromossomos foi realizada de acordo com a proposição de Levan et al. (1964).

RESULTADOS

Guyruita cerrado

As preparações cromossômicas testiculares submetidas à coloração seqüencial Giemsa - impregnação pelo íon prata mostraram a ocorrência de núcleos interfásicos pré-meióticos com três blocos heteropicnóticos positivos proeminentes, que correspondem a cromatina sexual (Fig. 1a). Adicionalmente, nestas preparações, núcleos profásicos I iniciais revelaram a presença de três filamentos fortemente impregnados pelo íon prata e dispostos próximos uns aos outros, mas não associados (Fig. 1b), os quais foram interpretados como cromossomos sexuais.

Espermatócitos I na fase de diplóteno e diacinese exibiram 30 bivalentes autossômicos regulares e uma estrutura inusitada com configuração de duas cruzes desiguais linearmente associadas (Fig. 1c, 2a, 2c, 2e) ou de uma cruz com um dos braços extremamente desigual em relação aos demais (Fig. 1d). Estas mesmas células submetidas à impregnação pelo íon prata demonstraram que os “cores”, centrômeros, e quiasmas de todos os elementos cromossômicos apareciam diferencialmente impregnados, possibilitando determinar que a estrutura inusitada correspondia a um trivalente sexual relacionado ao SCS do tipo XY_1Y_2 . No trivalente sexual, um braço do cromossomo X metacêntrico exibiu associação quiasmática intersticial com o braço longo do cromossomo Y_1 telo/acrocêntrico e o outro braço do

cromossomo X também demonstrou associação quiasmática intersticial com o braço longo do cromossomo Y_2 telo/acrocêntrico, na fase de diplóteno (Fig. 2). Contudo, somente um quiasma intersticial envolvendo um dos braços do cromossomo X e um do cromossomo Y_2 foi detectado na diacinese (Fig. 1d); nesta fase mais avançada da prófase I, seguramente a terminalização do quiasma entre X e Y_1 deve ocorrer.

Com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, células profásicas I submetidas a técnica de obtenção de bandas C e coradas com DAPI mostraram marcações tenuamente fluorescentes na região centromérica de alguns bivalentes autossômicos e na região terminal de ambos os braços do cromossomo X e do braço longo do cromossomo Y_1 (Fig. 2f).

Células metafásicas II coradas com Giemsa confirmaram a ocorrência de cromossomos meta, submetá, e telo/acrocêntricos em *G. cerrado* (Fig. 1e).

Oligoxystre bolivianum, *Oligoxystre caatinga* e *Oligoxystre rufoniger*

A análise de metáfases espermatogoniais das três espécies de *Oligoxystre*, coradas convencionalmente, mostrou $2n=18+X_1Y_1+X_2Y_2$ nos machos subadultos e adultos, com a maioria dos cromossomos meta/submetacêntricos, exceto um elemento que apresentou morfologia telo/acrocêntrica. Este elemento ímpar telo/acrocêntrico foi identificado como cromossomo sexual.

O cariótipo destas espécies revelou que os cromossomos decrescem gradualmente em tamanho (Fig. 3) e adicionalmente, permitiu identificar um elemento cromossômico metacêntrico extremamente grande e ímpar que também foi considerado cromossomo sexual. A identificação de todos os cromossomos sexuais e a determinação precisa do tipo de SCS somente foram possíveis através da

análise de células meióticas submetidas aos diferentes tipos de coloração e marcação de regiões específicas.

O cromossomo sexual X_1 metacêntrico é o maior elemento do cariótipo; o cromossomo Y_1 telo/acrocêntrico exibiu tamanho intermediário entre os pares autossômicos 8 e 9; os cromossomos X_2 e Y_2 meta/submetacêntricos são os menores elementos do complemento, sendo o cromossomo X_2 ligeiramente maior que o Y_2 (Fig. 3).

As metáfases mitóticas de *O. bolivianum*, *O. caatinga* e *O. rufoniger* coradas com Giemsa e seqüencialmente submetidas à impregnação pelo íon prata (Fig. 4) mostraram RONS típicas marcadas nas regiões terminais no braço longo de pares autossômicos. As RONS foram reveladas nos elementos cromossômicos dos pares 3 e 8 de *O. bolivianum* (Fig. 4a-b), pares 3, 6 e 8 de *O. caatinga* (Fig. 4c-d) e pares 3, 6 e 8 de *O. rufoniger* (Fig. 4e-f).

Com relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, somente metáfases mitóticas de *O. bolivianum* submetidas à coloração seqüencial Giemsa – técnica de obtenção de bandas C coradas com DAPI mostraram um padrão de bandas bem definido quanto à localização e quantidade de heterocromatina. Nesta espécie, bandas fortemente fluorescentes ocorreram na região pericentromérica na maioria dos pares autossômicos, com exceção dos elementos cromossômicos do par 1 que não exibiram bandas em toda extensão cromossômica (Fig 5a-b); os cromossomos sexuais também mostraram bandas muito fluorescentes na região pericentromérica, destacando-se aquelas do cromossomo X_2 que constituíam blocos proeminentemente maiores e mais fluorescentes que aquele presente no cromossomo Y_2 . Bandas C-DAPI adicionais foram detectadas na região terminal de

um dos braços cromossômicos do par 3 e do cromossomo sexual Y_2 . As bandas C-DAPI no cromossomo Y_2 sempre mostraram fluorescência tênue.

Padrões complementares de distribuição da heterocromatina constitutiva através do emprego de coloração seqüencial Giemsa–fluorocromos base-específicos DAPI e CMA_3 também foram obtidos somente nas metáfases espermatogoniais de *O. bolivianum*. Coloração seqüencial Giemsa–DAPI mostrou padrão de distribuição pericentromérico de seqüências de bases AT altamente repetidas muito semelhante aquele das bandas C coradas com DAPI, com exceção daquelas bandas C – DAPI adicionais na região terminal de um dos braços cromossômicos do par 3 e do cromossomo sexual Y_2 que não foram DAPI positivas (Fig. 5c, 5d). O emprego de coloração convencional Giemsa – CMA_3 revelou seqüência de bases GC altamente repetidas somente na região terminal do braço longo do cromossomo sexual Y_1 telo/acrocêntrico (Fig. 5c, 5d).

Nas três espécies de *Oligoxystre*, espermatócitos I na fase de paquíteno, corados convencionalmente com Giemsa exibiram dois filamentos finos, com regiões heteropicnóticas positivas e heteropicnóticas negativas, próximos um ao outro, mas não associados (Fig. 6a e 7a). Estes filamentos foram interpretados como bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 . Núcleos interfásicos pré-meióticos das três espécies de *Oligoxystre*, impregnados pelo íon prata, revelaram 4 filamentos fortemente impregnados não associados (Fig. 6b) que foram considerados como cromatina sexual correspondente aos cromossomos sexuais X_1 , Y_1 , X_2 , e Y_2 .

Células profásicas I, na fase de diplóteno e diacinese, das espécies de *Oligoxystre*, submetidas à coloração seqüencial Giemsa - impregnação pelo íon prata, exibiram 9 bivalentes autossômicos típicos quanto ao grau de condensação, sinapse e formação de quiasmas, e dois bivalentes de tamanhos diferentes não

regulares quanto ao grau de condensação e emparelhamento (Fig. 6c-f). Esses dois últimos bivalentes mostraram uma região cromossômica menos condensada e conseqüentemente, heteropicnótica negativa e outra região com grau de condensação e coloração semelhantes àquelas dos bivalentes autossômicos, isto é, isopicnótica (Fig. 6c e 6e). Nesta região isopicnótica de ambos os bivalentes sexuais, um quiasma intersticial ou terminal foi detectado. O emprego da técnica de impregnação pelo íon prata revelou os “cores” cromossômicos, as regiões centroméricas e os quiasmas de cada bivalente cromossômico, permitindo estabelecer que o bivalente não regular de maior tamanho correspondia ao bivalente sexual X_1Y_1 e aquele de menor tamanho, ao bivalente sexual X_2Y_2 . Em ambos os bivalentes sexuais, os cromossomos X_1 e X_2 meta/submetacêntricos exibiram um dos braços heteropicnótico negativo e o outro braço isopicnótico; os cromossomos Y_1 telo/acrocêntrico e o Y_2 submetacêntrico mostraram braços cromossômicos isopicnóticos.

Espermatócitos II na fase de metáfase mostraram $n=9+X_1+X_2$ e $n=9+Y_1+Y_2$ (Fig. 6g-h), confirmando a ocorrência do SCS do tipo $X_1Y_1+X_2Y_2$ nos machos das três espécies de *Oligoxystre*. Espermatócitos I nas fases de paquíteno, diplóteno e diacinese de todas as espécies de *Oligoxystre* estudadas, submetidos à coloração seqüencial Giemsa – técnica de obtenção de banda C coradas com DAPI confirmaram a ocorrência de grandes blocos de heterocromatina na região pericentromérica dos cromossomos que constituem os bivalentes autossômicos e os bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 (Fig. 7a-f), com exceção dos cromossomos do bivalente 1 que não exibiram bandas em toda a extensão cromossômica (Fig. 7d). Bandas C-DAPI adicionais foram observadas na região terminal dos cromossomos do bivalente 3 de *O. bolivianum* (Fig. 7d), confirmando o padrão de bandas C-DAPI

obtido nas metáfases espermatogoniais desta espécie (Fig. 5b). A associação dos resultados obtidos nos bivalentes sexuais sobre o padrão de picnose e de bandas C-DAPI pericentroméricas comprovou que os cromossomos X_1 e X_2 meta/submetacêntricos possuíam um braço heteropicnótico positivo e o outro, isopicnótico e que os cromossomos Y_1 telo/acrocêntrico e o Y_2 meta/submetacêntrico exibiam ambos os braços isopicnóticos (Fig. 7c-d). Além disso, foi possível confirmar que o cromossomo sexual X_2 meta/submetacêntrico possuía um bloco de bandas C-DAPI pericentromérico maior que aquele do cromossomo Y_2 meta/submetacêntrico. Células profásicas I de *O. caatinga* submetidas à coloração convencional com Giemsa–fluorocromo base-específico DAPI revelaram a presença de seqüências de base AT altamente repetidas na região pericentromérica dos cromossomos que constituíam os bivalentes autossômicos e os bivalentes sexuais, com exceção daqueles que compunham o bivalente 1 e do cromossomo Y_2 que não exibiram bandas ao longo de toda extensão cromossômica (Fig. 7g-h).

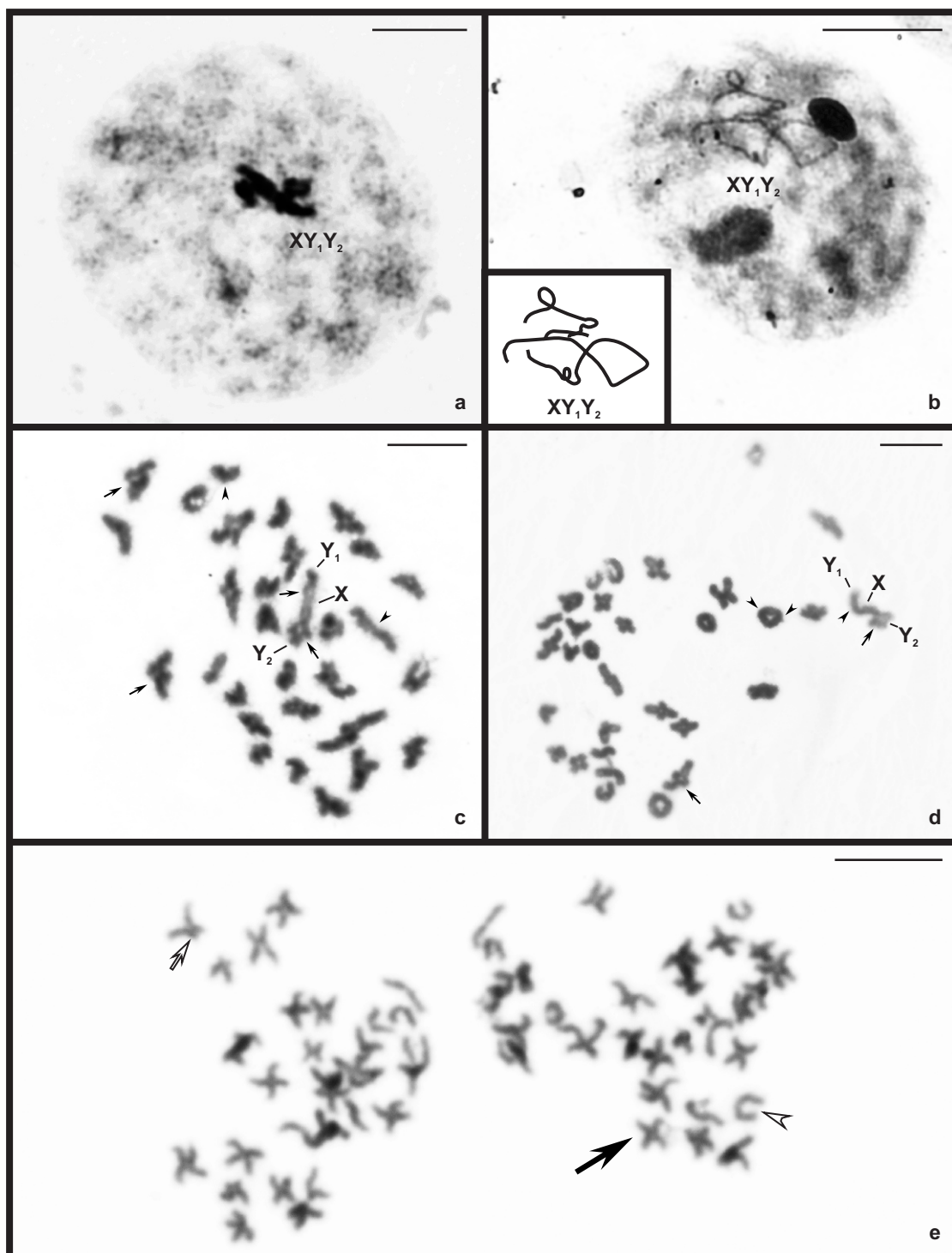


Figura 1. Células testiculares de *Guyruita cerrado* convencionalmente coradas com Giemsa (a, c, d, e) e impregnada pelo íon prata (b). **a.** Núcleo interfásico pré-meiótico com três blocos heteropichnóticos positivos que correspondem à cromatina sexual. **b.** Núcleo profásico I inicial com três filamentos diferencialmente impregnados pelo íon prata, que representam os cromossomos sexuais. O detalhe mostra uma representação esquemática dos cromossomos sexuais. **c.** Diplóteno tardio com $2n=30II+XY_1Y_2$, exibindo o trivalente sexual com dois quiasmas intersticiais (seta pequena). **d.** Diacinese com $2n=30II+XY_1Y_2$, denotando o trivalente sexual com um quiasma intersticial (seta pequena) e um terminal (cabeça de seta). **e.** Metáfases II com números cromossômicos incompletos; a esquerda com cerca de 28 cromossomos e a direita com aproximadamente 31, mostrando cromossomos metacêntricos (seta grande), submetacêntricos (seta vazia), e telo/acrocêntricos (cabeça de seta vazia). Seta pequena=quiasma intersticial; cabeça de seta=quiasma terminal. Escala=10 μ m.

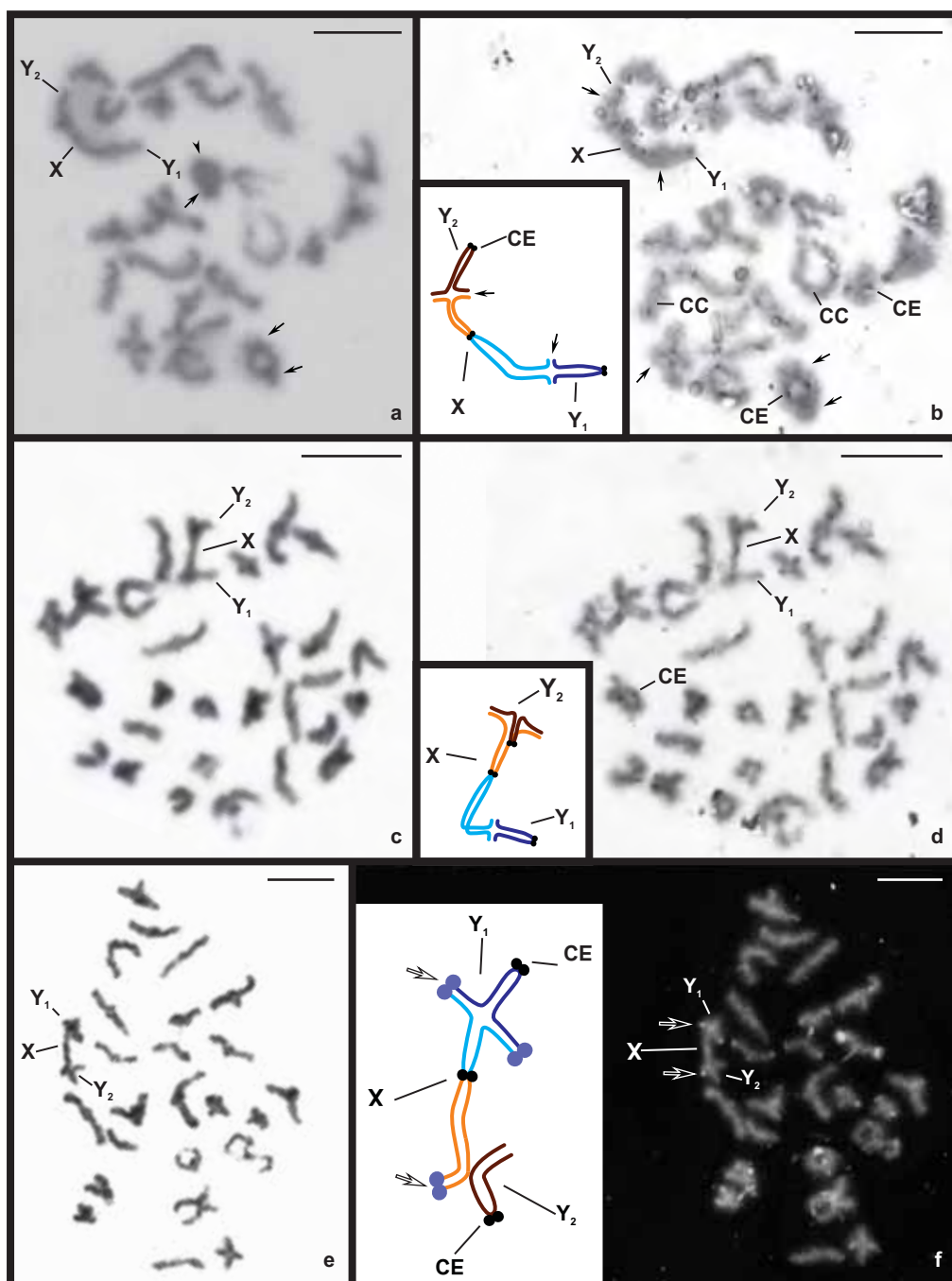


Figura 2. Espermatócitos I na fase de diplóteno de *Guyrulta cerrado* submetidos à coloração sequencial Giemsa-impregnação pelo íon prata (a, b e c, d) e Giemsa-técnica de obtenção de bandas C e coloração com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (e, f). **a, b.** Com número incompleto de bivalentes autossômicos, $2n=23II+XY_1Y_2$. **c, d.** Com número incompleto de bivalentes autossômicos, $2n=29II+XY_1Y_2$. Note o “core” cromossômico (CC), centrômero (CE), e quiasma intersticial (seta) e terminal (cabeça de seta) nos bivalentes autossômicos e trivalente sexual XY_1Y_2 . Os insertsos mostram uma representação esquemática da associação quiasmática entre um dos braços do cromossomo X e o braço longo do cromossomo Y_1 e entre o outro braço do cromossomo X e o braço longo do cromossomo Y_2 . **e, f.** Com número incompleto de bivalentes autossômicos, $2n=24II+XY_1Y_2$, mostrando marcação fluorescente tênue puntiforme (seta vazia) na região terminal de ambos os braços do cromossomo X e do braço longo do cromossomo Y_1 . O inserto mostra uma representação esquemática da associação quiasmática entre os elementos do trivalente sexual e da marcação fluorescente (círculos azuis) nos cromossomos X e Y_1 . Cromossomo X=laranja+azul claro; cromossomo Y_1 =azul escuro; cromossomo Y_2 =marrom. Escala=10µm.

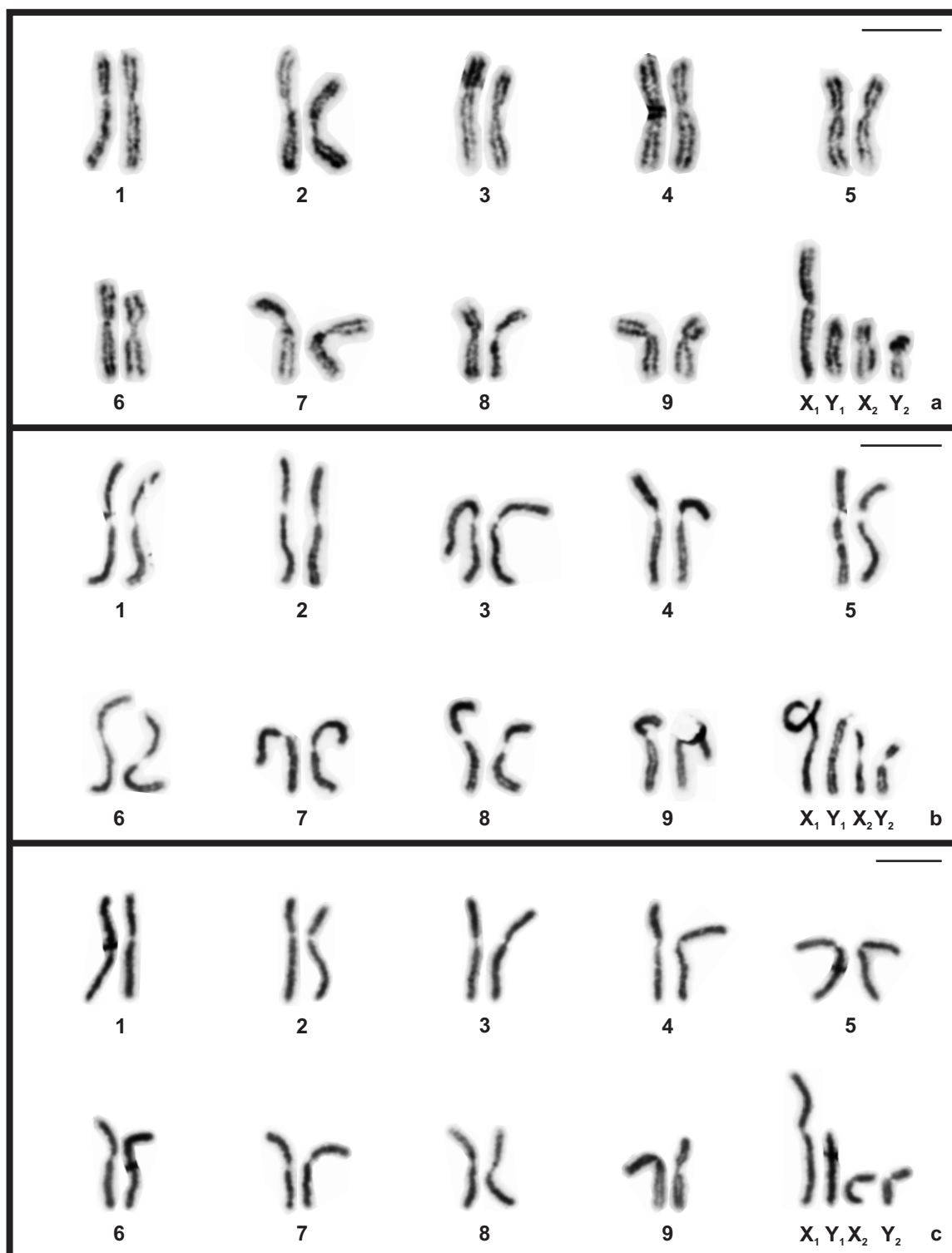


Figura 3. Cariótipos de representantes machos de *Oligoxystre* com $2n=22=18+X_1Y_1X_2Y_2$, em coloração convencional. **a.** *Oligoxystre bolivianum*. **b.** *Oligoxystre caatinga*. **c.** *Oligoxystre rufoniger*. Escala=10 μ m.

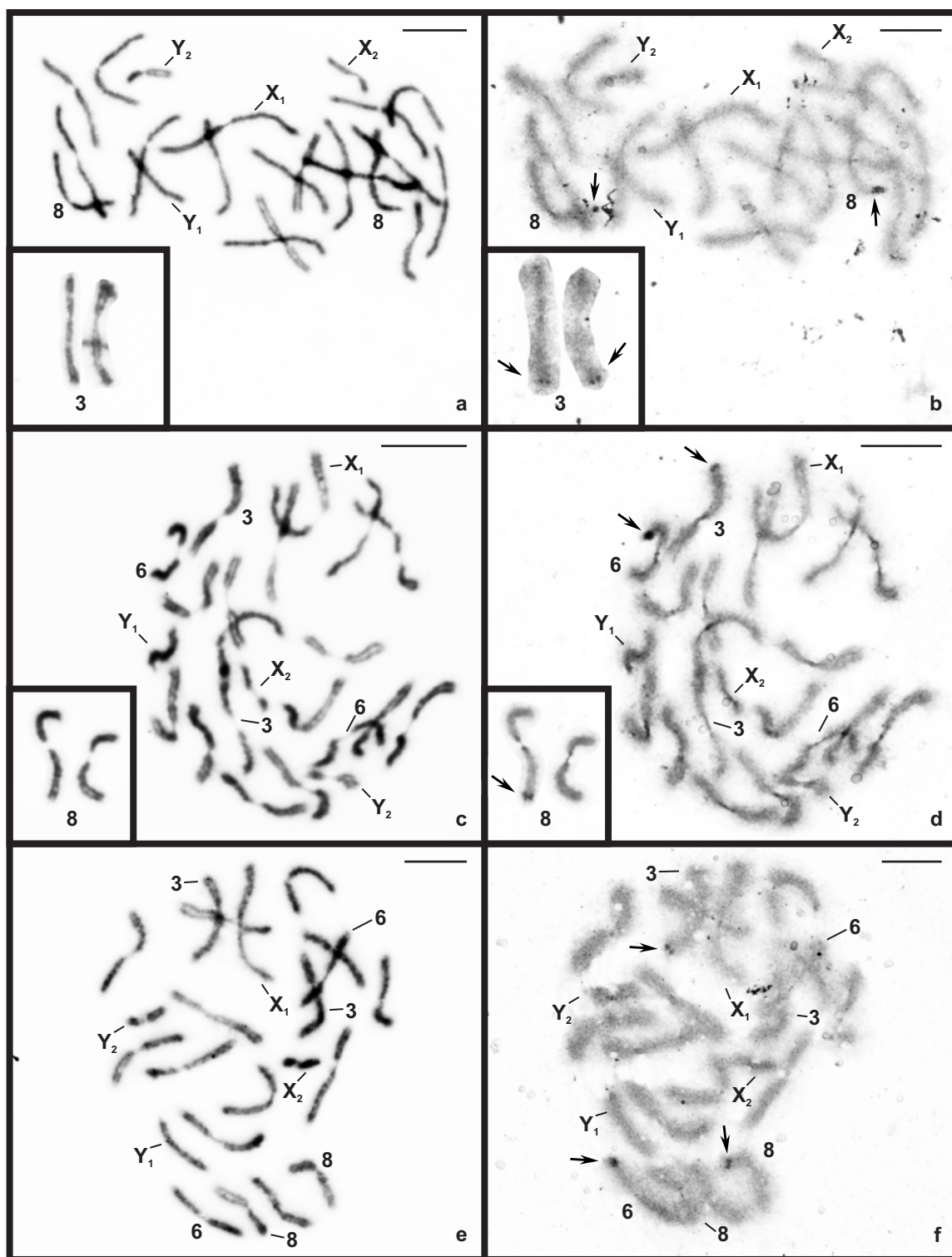


Figura 4. Metáfases mitóticas espermatogoniais de *Oligoxystre*, com $2n=22=18+X_1Y_1+X_2Y_2$, em coloração sequencial convencional com Giemsa (a, c, e)–impregnação pelo íon prata (b, d, f). **a-b.** *Oligoxystre bolivianum*, RDNs (setas) nos pares 3 (detalhe) e 8. **c-d.** *Oligoxystre caatinga*, RDNs (setas) nos pares 3, 6, e 8 (detalhe). **e-f.** *Oligoxystre rufoniger*, RDNs nos pares 3, 6, e 8. Escala=10µm.

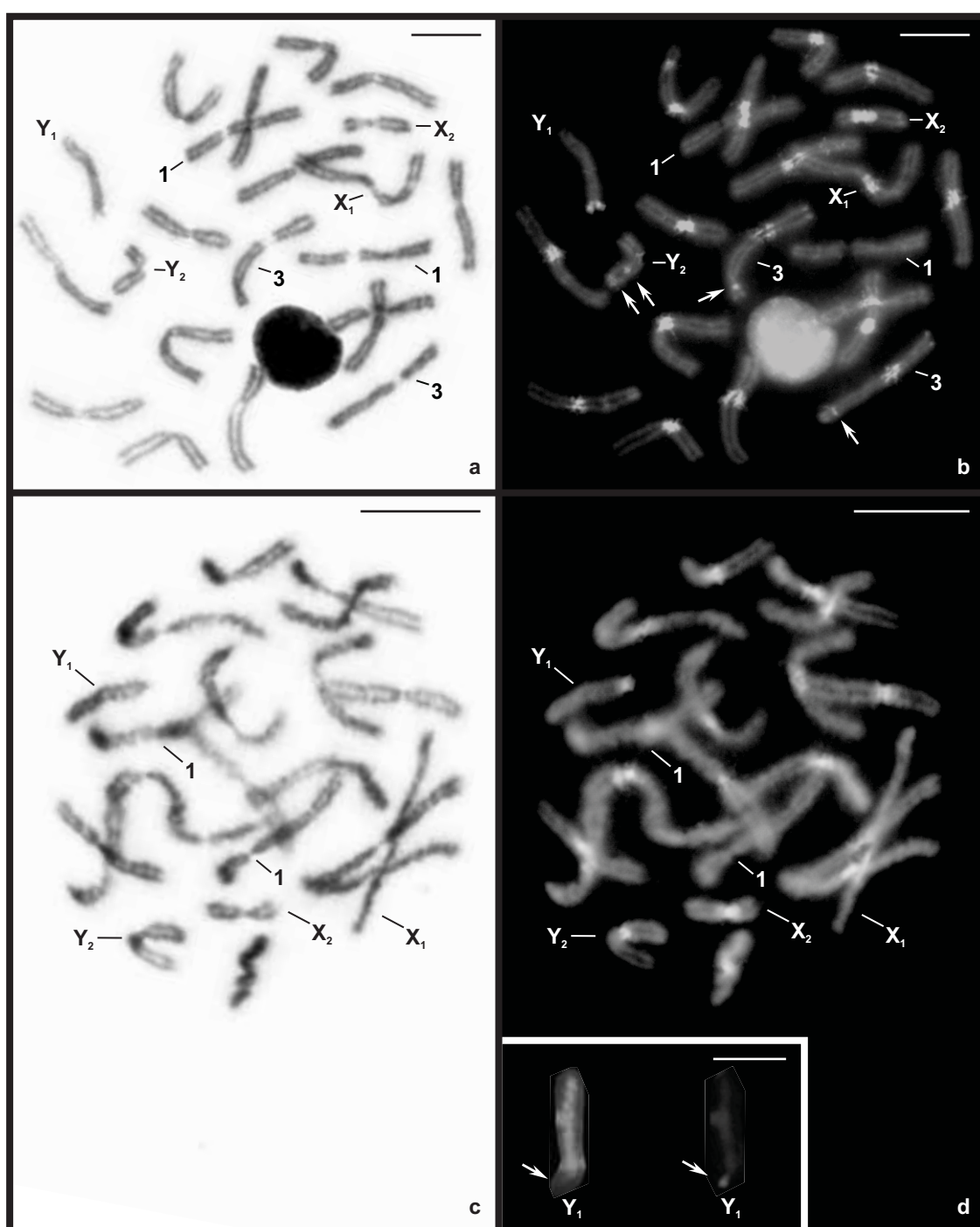


Figura 5. Metáfases mitóticas testiculares de *Oligoxystre bolivianum*, com $2n=22=18+X_1Y_1+X_2Y_2$. **a-b.** Coloração sequencial convencional com Giemsa – técnica de obtenção de bandas C coradas com fluorocromo base-específicos DAPI, mostrando bandas proeminentes na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, com exceção do par 1 que não exibiu bandas. As setas indicam bandas adicionais na região terminal de um dos braços dos cromossomos do par 3 e do cromossomo sexual Y_2 . **c-d.** Coloração sequencial convencional com Giemsa – fluorocromo base-específico DAPI, revelando seqüências de bases AT altamente repetidas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, com exceção do par 1 que não apresentou bandas DAPI positivas. A região terminal de um dos braços dos cromossomos do par 3 e do cromossomo Y_2 não mostrou bandas DAPI positivas. O inserto demonstra cromossomo sexual Y_1 de *O. bolivianum* submetido à coloração convencional Giemsa – fluorocromo DAPI – fluorocromo CMA_3 . Note a ausência de banda DAPI positiva na região pericentromérica e a ocorrência de região DAPI negativa – CMA_3 positiva na porção terminal do braço longo deste cromossomo (setas). Escala=10 μ m.

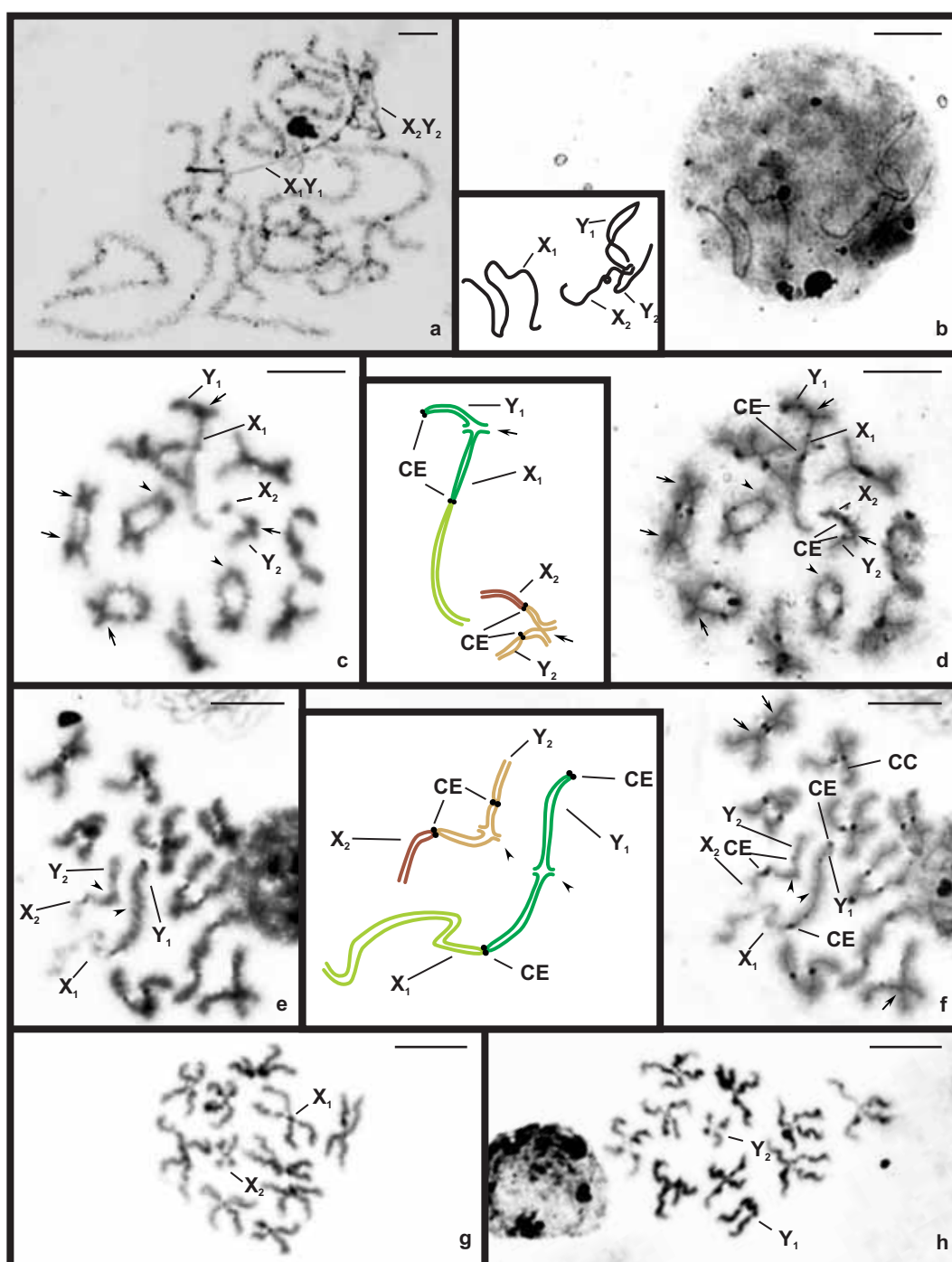


Figura 6. Espermatócitos de *Oligoxystre caatinga* (a, e-h) e *Oligoxystre bolivianum* (b, c-d), com coloração sequencial convencional com Giemsa (a, c, e, g, h) – impregnação pelo íon prata (b, d, f). **a.** Paquíteno, exibindo 2 filamentos finos com regiões heteropícnóticas positivas e negativas que correspondem aos bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 . **b.** Núcleo interfásico pré-meiótico com 4 filamentos de cromatina totalmente impregnados pelo íon prata relacionados aos cromossomos sexuais. **c-f.** Diplóteno (c-d) e diacinese (e-f) com $9II+X_1Y_1+X_2Y_2$, mostrando bivalentes sexuais com regiões heteropícnóticas negativas e regiões isopícnóticas (c-e), quiasma intersticial (seta) ou terminal (cabeça de seta) nas regiões isopícnóticas, centrômeros (CE), e “cores” cromossômicos (CC). Os detalhes mostram representações esquemáticas dos bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 com um quiasma intersticial (d) e com um quiasma terminal (f) entre os braços isopícnóticos do X_1Y_1 e do X_2Y_2 . **g-h.** Metáfases II com $n=11+9+X_1+X_2$ e $n=11+9+Y_1+Y_2$, respectivamente. Cromossomo X_1 =verde claro+verde escuro; cromossomo Y_1 =verde escuro; cromossomo X_2 =marrom+bege; cromossomo Y_2 =bege. Escala=10μm.

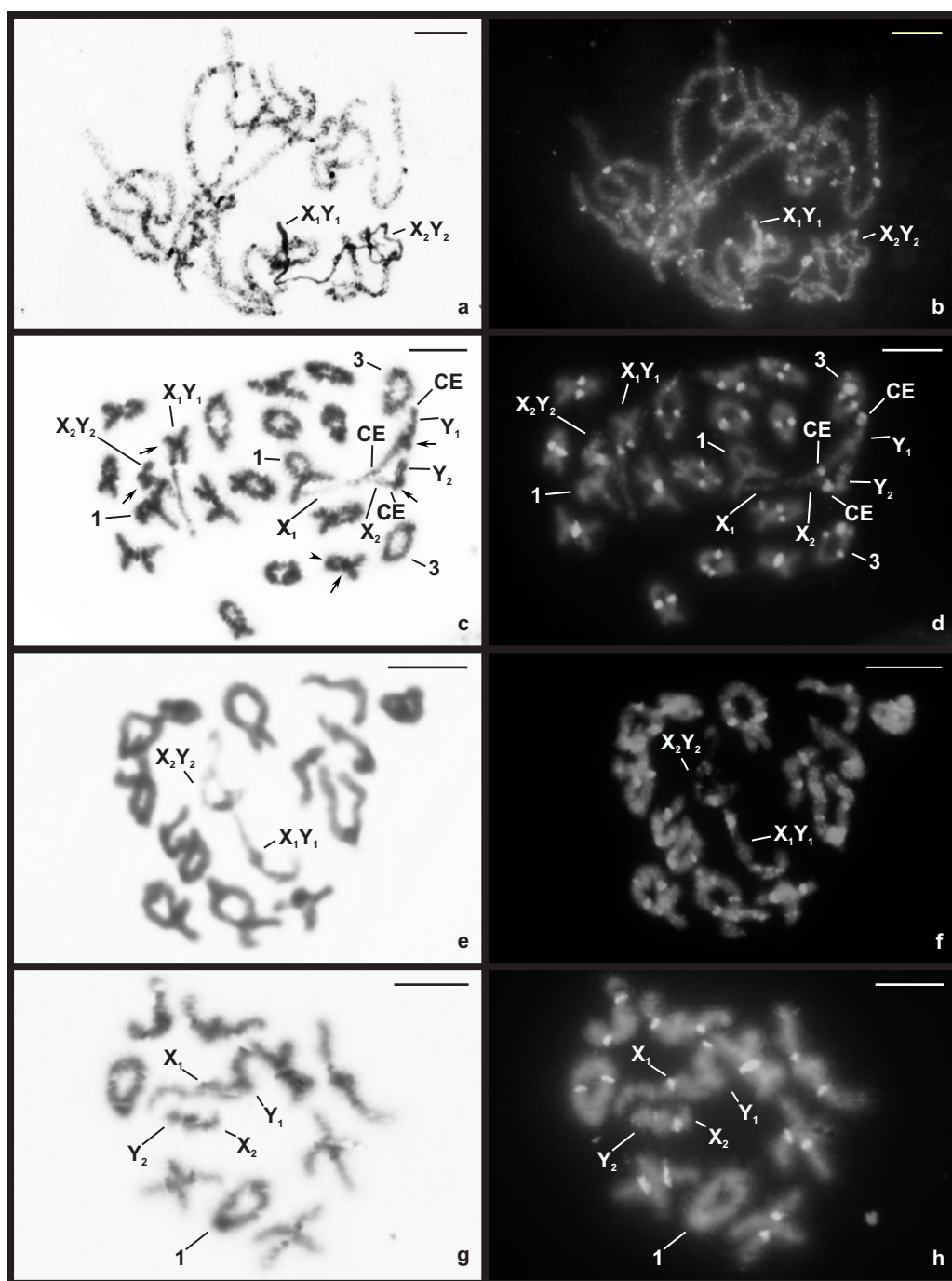


Figura 7. Espermatócitos I de *Oligoxystre caatinga* (a, b, e-h) e de *Oligoxystre bolivianum* (c,d), submetidos a coloração sequencial convencional com Giemsa - técnica de obtenção de bandas C coradas com DAPI (a-f) e coloração sequencial com Giemsa - fluorocromo base-específico DAPI (g-h). **a-b.** Paquíteno, exibindo bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 com regiões heteropicnóticas positivas e negativas (a) e bivalentes autossômicos e sexuais com bandas C – DAPI pericentroméricas (b). **c-d.** Duas células diplotênicas, com $9II+X_1Y_1+X_2Y_2$ em cada célula, mostrando bivalentes sexuais com uma região heteropicnótica negativa e outra, isopicnótica (c) e com bandas C-DAPI pericentroméricas proeminentes no X_1 , Y_1 , e X_2 (d). Note bivalente 1 sem bandas C-DAPI e bivalente 3 com bandas C-DAPI adicionais àquelas pericentroméricas. Seta=quiasma intersticial; cabeça de seta=quiasma terminal; CE=centrômero. **e-f.** Diacinese, com $9II+X_1Y_1+X_2Y_2$ e bandas C-DAPI tênues nas regiões pericentroméricas dos bivalentes autossômicos e sexuais. **g-h.** Diacinese, com $9II+X_1Y_1+X_2Y_2$ e bandas DAPI positivas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos que formam os bivalentes autossômicos e os bivalentes sexuais, com exceção do bivalente 1 e do cromossomo Y_2 que não exibiram bandas DAPI fluorescentes. Escala=10µm.

DISCUSSÃO

Embora o principal enfoque deste trabalho seja a descrição dos SCS do tipo XY_1Y_2 e $X_1Y_1+X_2Y_2$, ambos não registrados nas espécies de aranhas já analisadas do ponto de vista citogenético, e dos mecanismos cromossômicos envolvidos na origem destes tipos de sistemas, vale a pena ressaltar que a inspeção de aspectos relacionados ao comportamento dos cromossomos na meiose (condensação, sinapse, quiasma e segregação) foi extremamente importante para estabelecer os tipos de SCS e os possíveis rearranjos cromossômicos que ocorreram no processo de origem destes sistemas.

Araneae possui três linhagens filogenéticas, Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae. Mesothelae constitui um grupo basal e Araneomorphae inclui dois subgrupos, Haplogynae e Entelegynae, dos quais o último é considerado derivado (Coddington & Levi, 1991). Levando-se em conta que número diplóide alto ($2n=\pm 96$) está presente em Mesothelae e também ocorre em espécies de Mygalomorphae, alguns pesquisadores têm proposto que a evolução cromossômica nas aranhas tem se processado por redução do número diplóide, através de rearranjos somente entre os autossomos ou entre os autossomos e os cromossomos sexuais (Suzuki, 1954; Král et al., 2006). Entretanto, a ampliação dos estudos citogenéticos, principalmente em espécies de grupos basais, tem revelado a presença de números diplóides baixos, como o $2n=14$ e $2n=16$ descritos (Akan et al., 2005; Řezač et al., 2006) para dois representantes de Mygalomorphae pertencentes a diferentes famílias.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que *G. cerrado* possui $2n=63$ e as três espécies do gênero *Oligoxystre*, $2n=22$. Estes números diplóides são inéditos para a família Theraphosidae e para espécies de migalomorfas como um todo; além disso, o $2n=22$ é um dos menores números cromossômicos verificado

para as aranhas desta infraordem. Estas informações indicam que número diplóide baixo não representa um fato inusitado para as aranhas Mygalomorphae, mas a sua baixa frequência neste grupo e ausência em Mesothelae possivelmente é decorrente do pequeno número de espécies investigadas sob o ponto de vista citogenético. Adicionalmente, estes dados levantam a possibilidade de que a evolução cromossômica em aranhas não ocorreu de modo linear, ou seja, através da redução do número diplóide dos grupos basais para os derivados, mas pelo contrário, de que a diferenciação cariotípica, quer seja pela diminuição ou aumento do número cromossômico, ocorreu diversas vezes e de maneira independente, nas diferentes linhagens de Araneae.

Nas Entelegynae ($2n=10$ a $2n=\pm 52$, com morfologia cromossômica predominantemente telo/acrocêntrica e SCS do tipo X_1X_20 na maioria das espécies, seguido pelos tipos $X0$, $X_1X_2X_30$, $X_1X_2X_3X_40$, XY , $X_1X_2X_3Y$, $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ e X_nY_n), os rearranjos cromossômicos concernentes a origem dos SCS simples e múltiplos parecem ter envolvido predominantemente os cromossomos sexuais X. Por outro lado, nos grupos filogeneticamente basais de Araneae, isto é, Haplogynae ($2n=7$ a $2n=40$), Hypochilidae ($2n=29$), Austrochilidae ($2n=38$), Mygalomorphae ($2n=14$ a $2n=110$) e Mesothelae ($2n=\pm 96$), com os cromossomos predominantemente meta/submetacêntricos e SCS do tipo $X0$, XY , $NeoXY$, X_1X_2Y , e X_1X_20 , e $X_1X_2X_3X_40$ os rearranjos cromossômicos responsáveis pela diferenciação dos sistemas $NeoXY$ e X_1X_2Y parecem ter envolvido o cromossomo sexual X e autossomos (Silva, 1988; Řezač et al., 2006) e na diferenciação dos sistema $X0$, XY , e $X_1X_2X_3X_40$ os rearranjos cromossômicos parecem ter acontecido entre os cromossomos sexuais X_1 e X_2 ou entre os cromossomos sexuais X_1 , X_2 e Y (Král et al., 2006, 2011; Řezač et al., 2006).

Assim como em outras espécies basais de Araneae, a diferenciação dos cromossomos sexuais de *G. cerrado* e das espécies de *Oligoxystre* está relacionada a rearranjos entre os cromossomos sexuais e autossomos. Em *G. cerrado* a origem SCS do tipo XY_1Y_2 parece ter envolvido rearranjos entre o cromossomo sexual X, do sistema XO , e dois pares autossômicos (Figura 8). Na evolução deste sistema, um elemento autossômico acrocêntrico sofreu fissão cêntrica e posterior fusão em tandem com um dos braços do cromossomo X metacêntrico; o elemento homólogo deste cromossomo fusionado a um dos braços do X passou a funcionar como cromossomo sexual Y_1 . Outra fusão em tandem, envolvendo um elemento autossômico adicional, ocorreu no outro braço do cromossomo sexual X; neste processo, o cromossomo homólogo aquele fusionado ao X constituiu o Y_2 . Os fragmentos cênicos de ambos os autossomos fusionados ao cromossomo X foram perdidos. Os segmentos cromossômicos de ambos os elementos fusionados ao cromossomo X ainda retêm uma grande região de homologia com os seus correspondentes autossômicos (Y_1 e Y_2), pois durante fases iniciais da meiose foi observado quiasma intersticial entre o cromossomo X e os cromossomos Y_1 e Y_2 .

Considerando o comportamento assináptico entre os bivalentes sexuais X_1Y_1 e X_2Y_2 de *Oligoxystre* durante a meiose, é possível inferir que a evolução dos cromossomos sexuais provavelmente se deu a partir de um sistema X_1X_2O (Figura 9). Neste processo, provavelmente ocorreu duas fusões em tandem entre elementos autossômicos acêntricos não homólogos e os cromossomos sexuais: a primeira em um braço do cromossomo X_1 e a outra, em um dos braços do cromossomo X_2 . Os dois cromossomos autossômicos homólogos aqueles fusionados ao cromossomo X_1 e X_2 deram origem aos cromossomos sexuais Y_1 e Y_2 acrocêntricos, respectivamente.

Alternativamente, a diferenciação do sistema $X_1Y_1+X_2Y_2$ poderia ter ocorrido a partir de um sistema X_0 (Figura 10). Neste evento, inicialmente, o cromossomo X metacêntrico sofreu fissão cêntrica, dando origem aos cromossomos X_1 e X_2 acrocêntricos. Posteriormente, houve fusões cêntricas, entre dois cromossomos autossomos não homólogos, também acrocêntricos, e os cromossomos X_1 e X_2 , resultando em cromossomos sexuais X metacêntricos. Os elementos autossômicos homólogos aqueles fusionados ao cromossomo X_1 e X_2 deram origem aos cromossomos sexuais Y_1 e Y_2 . A presença de quiasma entre os cromossomos X_1 e Y_1 e entre os cromossomos X_2 e Y_2 indica que os segmentos autossômicos destes cromossomos sexuais ainda não estão totalmente diferenciados e guardam regiões de homologia.

Preparações cromossômicas das quatro espécies de Theraphosidae aqui analisadas foram submetidas à impregnação pelo íon prata para identificar as RONS ativas; porém, nas células de *G. cerrado* não foram observadas marcações correspondentes às RONS. As três espécies de *Oligoxystre* revelaram RONS somente sobre a região terminal de pares autossômicos. Este padrão de distribuição das RONS é o mais freqüente para as aranhas (Araujo et al., 2012) e também foi observado na única espécie de Mygalomorphae, pertencente à família Dipluridae, analisada sob este aspecto, a qual exibiu quatro RONS sobre dois pares de cromossomos autossômicos (Král et al., 2011).

Embora as três espécies do gênero *Oligoxystre* mostraram RONS autossômicas, diferenças foram observadas quanto ao número e localização destas regiões, ou seja, *O. bolivianum* apresentou quatro RONS sobre os pares 3 e 8 enquanto que *O. caatinga* e *O. rufoniger* revelaram seis RONS sobre os pares 3, 6, 8, respectivamente. Este resultado indica que a presença de RON sobre os pares 3

e 8 constitui um caráter compartilhado por estas espécies e que a evolução cariotípica de *Oligoxystre* envolveu modificações em regiões cromossômicas específicas sem alteração na estrutura macro-cariotípica, a qual parece ser altamente conservada entre as espécies examinadas. Desta forma, a análise citogenética de outras espécies de *Oligoxystre*, principalmente através de metodologias que identificam longitudinalmente os cromossomos, é imprescindível para estabelecer os eventos responsáveis pela diferenciação cariotípica interespecífica nas aranhas deste gênero.

O emprego de técnicas que identificam regiões de heterocromatina constitutiva não forneceu dados que permitissem a diferenciação interespecífica das espécies de *Oligoxystre* que possuem cariótipos semelhantes; porém, foi extremamente importante para auxiliar na identificação dos cromossomos sexuais das quatro espécies investigadas neste trabalho. Além disso, a presença de pequenos blocos de heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais de *G. cerrado* e *Oligoxystre* indica que o SCS destas espécies teve uma origem recente, uma vez que o acúmulo de seqüências de base de DNA altamente repetidas e o bloqueio na recombinação gênica entre segmentos homólogos são os principais fatores responsáveis pela diferenciação dos cromossomos sexuais em diferentes organismos.

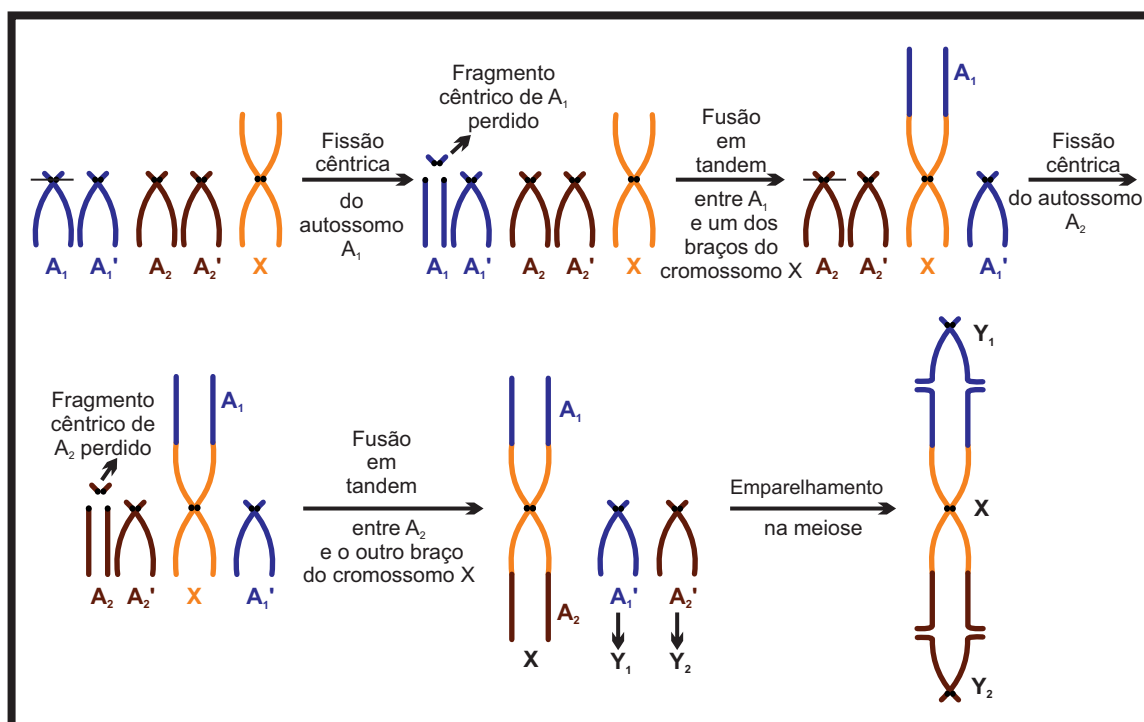


Figura 8. Representação esquemática da proposta de origem do sistema cromossômico sexual do tipo XY₁Y₂ de *Guyruita cerrado* a partir de um sistema X0. A₁-A₁' e A₂-A₂' = pares autossômicos.

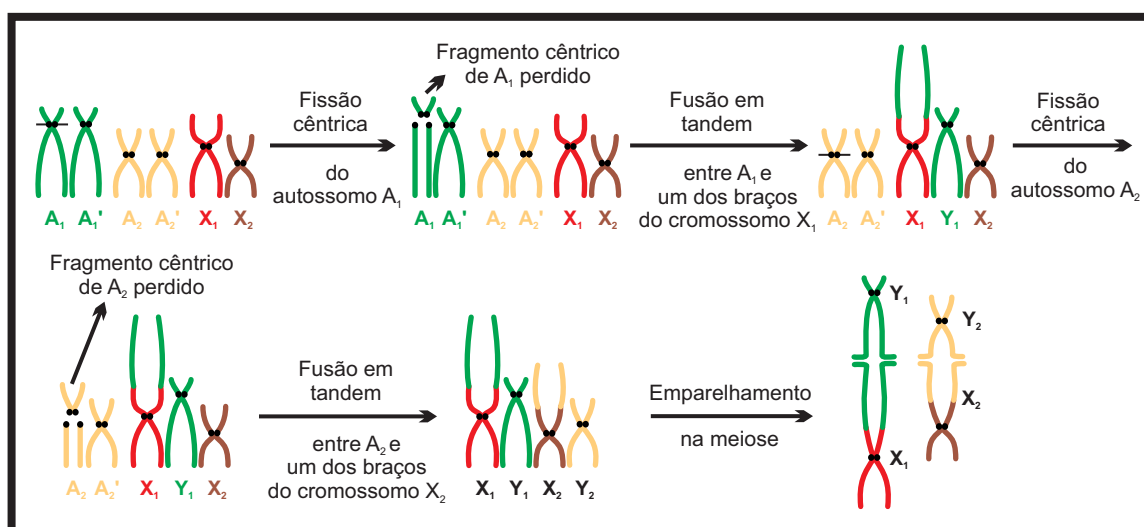


Figura 9. Representação esquemática da origem hipotética do sistema cromossômico sexual do tipo $X_1Y_1+X_2Y_2$ das espécies de *Oligoxystre* a partir de um sistema X_1X_20 . A_1-A_1' e A_2-A_2' = pares autossômicos.

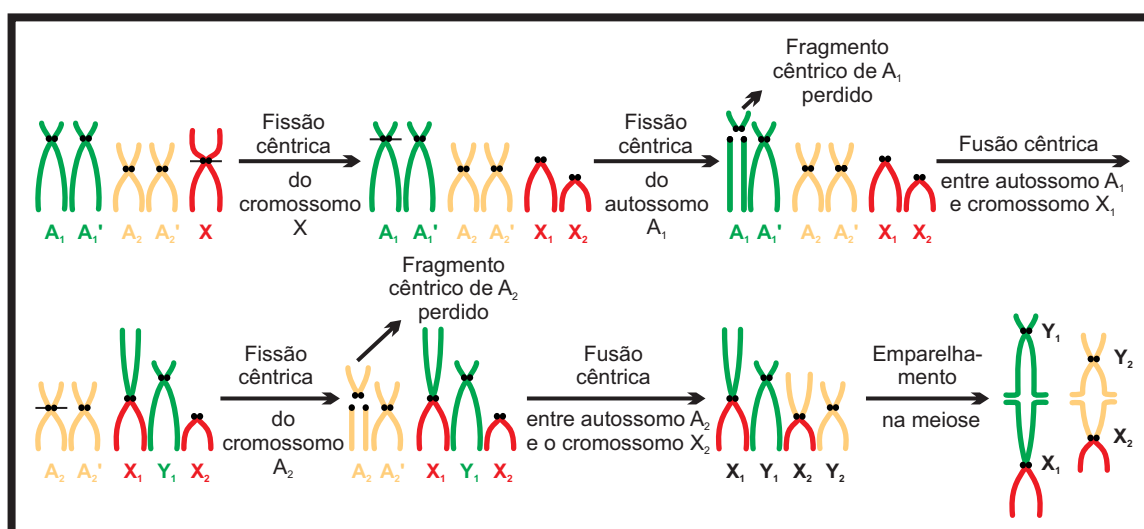


Figura 10. Representação esquemática da hipótese alternativa de origem do sistema cromossômico sexual do tipo $X_1Y_1+X_2Y_2$ das espécies de *Oligoxystre* a partir do sistema X_0 . A_1-A_1' e A_2-A_2' = pares autossômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akan, Z.; Varol, I.; Özaslan, M. 2005: A Cytotaxonomical investigation on spiders (Arachnida: Araneae). *Environmental Biotechnology*. 19: 101-104.

Araujo, D.; Cella, D.M.; Brescovit, A.D. 2005: Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. *Brazilian Journal of Biology*. 65(2): 193-202.

Araujo, D.; Schneider, M.C; Paula-Neto, E; Cella, D.M. 2012: Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. *InTech – Open Access Publisher*. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/sex-chromosomes-and-meiosis-of-spiders-a-review>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

Araujo, D.; Schneider, M.C.; Paula-Neto, E.; Cella, D.M. 2013. The spider cytogenetic database, versão 1.0. Disponível em: <www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase>. Acesso em: 01 abr. 2013.

Bressa, M.J.; Papeschi, A.G.; Vítková, M.; Kubícková, S.; Fuková, I.; Pigozzi, M.I.; Marec, F. 2009: Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenetic and Genome Research*. 125: 125-292.

Christian, A.; McNiel, E.; Robinson, J.; Drabek, R.; LaRue, S.; Waldren, C.; Bedford, J. 1998: A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetics and Cell Genetic*. 82: 172-179.

Coddington, J.A. & Levi, H.W. 1991: Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 565-592.

Hetzler, S. 1979: Some studies of spider chromosomes. *American Arachnology*. 20: 20-20.

Howell, W.M. & Black, D.A. 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.

Král, J.; Musilová, J.; St'áhlavsky, F.; Rezác, M.; Akan, Z.; Edwards, R.L.; Coyle, F.A.; Almerje, C.R. 2006: Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae, Araneomorphae). *Chromosome Research*. 14: 859-880.

Král, J.; Korínková, T.; Forman, M.; Krkavcová, L. 2011: Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenetic and Genome Research*. 133: 43-66.

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

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

Platnick, N.I. 2013: The world spider catalog, versão 13.5. *American Museum of Natural History*. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

Řezač, M.; Král, J.; Musilová, J.; Pekár, S. 2006: Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas*. 143: 123-129.

Silva, D. 1988: Estudio cariotípico de *Loxosceles laeta* (Araneae: Loxoscelidae). *Revista Peruana de Entomologia*. 31: 9-12.

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

Sumner, A.T. 1972: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 75: 304-306.

Sumner, A.T. 2003: Chromosomes: organization and function. *Blackwell Publishing, North Berwick, UK*. 287 pp.

Suzuki, S. 1949: Cytological studies of some spiders. *Zoological Magazine*. 58: 89-90.

Suzuki, S. 1950: Sex determination and karyotypes in spiders. *Zoological Magazine*. 59: 31-32.

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

Traut, W.; Sahara, K.; Otto, T.D.; Marec, F. 1999: Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*. 108: 173-180.

Vítková, M.; Král, J.; Traut, W.; Zrzavý, J.; Marec, F. 2005: The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Research*. 13: 145-156.

ARTIGO II

Análise citogenética comparativa entre espécies da família Filistatidae
(Araneomorphae, Haplogynae)

Paula-Neto, E^{1*}; Schneider, MC^{2*}; Penna-Gonçalves, V³; Brescovit, AD⁴; Cella, DM¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, SP, Brasil, E-mail: emygdiopn@hotmail.com

²Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Ciências Biológicas, Diadema, SP, Brasil, E-mail: marielle.unifesp@gmail.com

³Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, E-mail: vanbioloka@gmail.com

⁴Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, E-mail: adbresc@terra.com.br

*Autores correspondentes: emygdiopn@hotmail.com; marielle.unifesp@gmail.com

RESUMO

A família Filistatidae possui 112 espécies descritas taxonomicamente, as quais estão agrupadas em 17 gêneros. Análises filogenéticas revelaram que os gêneros de Filistatidae estão subdivididos em duas subfamílias: Filistatinae e Prithinae. Citogeneticamente, somente duas espécies de Filistatinae foram descritas, *Filistata insidiatrix* ($2n=33, X_1X_2Y$) e *Kukulcania hibernalis* ($2n=24, X_1X_20$). O objetivo deste trabalho é apresentar dados citogenéticos inéditos, em coloração convencional e diferencial, de duas espécies de Filistatidae, pertencentes a subfamílias distintas, *Kukulcania hibernalis* (Filistatinae) e *Misionella mendensis* (Prithinae), e contribuir para o entendimento dos mecanismos de evolução cromossômica que tem ocorrido neste grupo. As preparações cromossômicas foram obtidas de gônadas de indivíduos adultos e embriões, submetidas à coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação pelo íon prata. A análise de células mitóticas e meióticas de *K. hibernalis* revelou $2n=25$ para machos, $2n=26$ para fêmeas e sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$. Todos os cromossomos exibiram morfologia metacêntrica, exceto um elemento do par 9, que apresentou morfologia submetacêntrica. Em núcleos profásicos I, os cromossomos sexuais estavam localizados próximos uns aos outros, porém sem associação. Durante o diplóteno, foi possível visualizar um trivalente sexual, além de 11 bivalentes autossômicos. Células impregnadas pelo íon prata revelaram regiões organizadoras de nucléolo (RONs) na região terminal dos pares 1, 5 e 10. O emprego do bandamento C e coloração com DAPI mostrou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões terminais de ambos os braços dos cromossomos autossômicos e sexuais. Além disso, bandas C intersticiais foram visualizadas no par 4 e o cromossomo sexual Y apresentou-se completamente heterocromático. O estudo de cariótipos de

indivíduos machos de *M. mendensis* exibiu o número diploide $2n=21$, SCS do tipo X_1X_2Y e morfologia meta/submecêntrica dos cromossomos. A análise de células testiculares meióticas revelou que o comportamento dos cromossomos sexuais foi semelhante daquele àquele observado em *K. hibernalis*. Em *M. mendensis*, as RONS estavam localizadas na região terminal dos pares 1, 3 e 5. Células submetidas ao bandamento C e coradas com DAPI evidenciaram HC na região pericentromérica de todos os cromossomos, além de blocos adicionais na região intersticial dos pares 5 e 8. Embora as informações citogenéticas para Filistatidae sejam escassas, os resultados disponíveis mostram a ocorrência de uma grande variabilidade de número diploide neste grupo, porém a manutenção do SCS do tipo X_1X_2Y . Adicionalmente, a diferenciação cariotípica entre as espécies desta família parece não ter envolvido apenas o número de autossomos, mas também sítios cromossômicos específicos, como as regiões de heterocromatina constitutiva.

Palavras-chave: cariótipo, heterocromatina constitutiva, meiose, região organizadora de nucléolo, trivalente sexual

INTRODUÇÃO

A família Filistatidae é composta por 112 espécies, agrupadas em 17 gêneros, e apresenta uma ampla distribuição geográfica, com maior diversidade em regiões tropicais e subtropicais (Gray, 1995; Ramírez e Grismado, 1997; Platnick, 2013). Dentre as aranhas da linhagem Haplogynae, Filistatidae é considerada basal, constituindo grupo irmão de todas as outras 24 famílias, que correspondem ao clado das haploginas derivadas (Coddington e Levi, 1991; Platnick, 2013).

Do ponto de vista filogenético, há poucos estudos quanto à relação entre os gêneros de Filistatidae. Contudo, Gray (1995) e Ramírez e Grismado (1997) subdividiram a família em dois grupos: Filistatinae e Prithinae. A subfamília Filistatinae compreende três gêneros, *Sahastata*, *Filistata* e *Kukulcania*, enquanto Prithinae inclui *Filistatinella*, *Filistatoides*, *Lihuelistata*, *Misionella*, *Pikelinia*, *Afrofilistata*, *Andoharano*, *Pritha*, *Yardiella* e *Wandella*, totalizando dez gêneros (Ramírez e Grismado, 1997). Esta proposta filogenética não incluiu os quatro outros gêneros pertencentes a Filistatidae, *Microfilistata*, *Pholcoides*, *Triculamus* e *Zaitunia* (Platnick, 2013).

Citogeneticamente, apenas duas espécies de Filistatidae foram investigadas, *Filistata insidiatrix* e *Kukulcania hibernalis*, as quais apresentaram cariótipos com $2n=33$, X_1X_2Y e $2n=24$, X_1X_20 , respectivamente. Em ambas as espécies, os cromossomos mostraram morfologia meta/submetacêntrica (Rodríguez Gil et al., 2002; Král et al., 2006). No presente trabalho, duas espécies de Filistatidae pertencentes a diferentes subfamílias foram analisadas, *Kukulcania hibernalis* (Filistatinae) e *Misionella mendensis* (Prithinae), com o objetivo de adicionar dados citogenéticos em coloração convencional e diferencial, e contribuir para o

entendimento dos mecanismos de evolução cromossômica que ocorreram nesta família.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, uma amostra composta por 19 exemplares de Filistatidade foi analisada, a qual incluiu: oito indivíduos machos e quatro indivíduos fêmeas de *Kukulcania hibernalis* (Hentz, 1842) provenientes de Barra do Jacaré (23°06'54"S, 50°10'51"W), Paraná, Brasil; três exemplares machos e quatro embriões (três machos e uma fêmea) de *Misionella mendensis* (Mello-Leitão, 1920) coletados nos municípios de Rio Claro (22°24'39"S, 47°33'39"W) e São Paulo (23°32'52"S, 46°38'9"W), São Paulo, Brasil. Todos os exemplares analisados foram depositados na coleção do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil (IBSP, curadora Darci Moraes Barros-Battesti).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de gônadas de indivíduos adultos e embriões, seguindo a metodologia descrita por Araujo et al. (2005). Todas as preparações citológicas foram convencionalmente coradas com solução de Giemsa a 3%. Para a identificação das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e localização das regiões de heterocromatina constitutiva, algumas preparações cromossômicas foram submetidas às técnicas de impregnação pelo íon prata (Howell e Black, 1980) e bandamento C (Sumner, 1972), respectivamente. Para uma melhor resolução do padrão de bandas C, os cromossomos foram corados com 4-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Todas as células foram fotografadas em um microscópio Olympus BX 51, com câmera digital acoplada DP 71, utilizando o software DP Controller. As medidas cromossômicas foram realizadas através do

plugin LEVAN, desenvolvido por Sakamoto e Zacaro (2009). A classificação morfológica dos cromossomos seguiu a proposta de Levan et al. (1964).

RESULTADOS

Kukulcania hibernalis

A análise de metáfases mitóticas de *K. hibernalis* revelou o número diploide $2n=25$ para machos e $2n=26$ para fêmeas (Figura 1a-b). O estudo comparativo de células mitóticas de machos e fêmeas e células metafásicas II de machos, mostrou a presença de um sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ para esta espécie (Figura 1). O cariótipo de indivíduos machos é composto por cromossomos de tamanho grande (pares 1 e 2), médios (pares 3 a 10) e pequeno (par 11). Os cromossomos sexuais X_1 e X_2 , possuem tamanho médio e o cromossomo Y é extremamente pequeno, sendo identificado como o menor elemento do cariótipo. Todos os cromossomos apresentaram morfologia metacêntrica, com exceção de um dos elementos do par 9, que era submetacêntrico (Figura 1a). Este heteromorfismo, relacionado ao par 9, foi identificado em três exemplares machos, nos quais foi possível realizar uma análise cariotípica mais detalhada. Uma constrição secundária foi facilmente visualizada na região terminal do braço curto de ambos os elementos do par 10.

Núcleos profásicos I iniciais evidenciaram três blocos heteropicnóticos positivos, sendo dois grandes e um pequeno, os quais foram interpretados como correspondentes à cromatina sexual (Figura 2a). Células diplotênicas exibiram 11 bivalentes autossômicos com um quiasma terminal ou intersticial (Figura 2b-f), exceto o bivalente de maior tamanho que, ocasionalmente, apresentou dois quiasmas, sendo um terminal e outro intersticial (Figura 2b, d). Os cromossomos

sexuais foram facilmente identificados, uma vez que formavam uma configuração trivalente, com todos os elementos associados através de suas regiões terminais. Nesta associação, ambos os braços dos cromossomos X_1 e X_2 estavam associados de forma aquiasmática com ambos os braços do cromossomo Y, o qual sempre assumia uma posição central nesta configuração trivalente (Figura 2b-f). Nesta subfase da meiose, todos os bivalentes autossômicos e o trivalente sexual, apresentaram-se isopicnóticos.

Metáfases espermatogoniais submetidas à coloração sequencial Giemsa – impregnação pelo íon prata, revelaram a ocorrência de seis RONS localizadas na região terminal do braço curto dos pares 1, 5 e 10 (Figura 3). No entanto, na amostra de células analisada, o número de cromossomos marcados pelo íon prata variou de dois a cinco. Adicionalmente, as RONS localizadas nos elementos do par 10, corresponderam às regiões de constrição secundária, evidenciadas em células coradas com Giemsa.

Células testiculares coradas com Giemsa, e posteriormente submetidas ao bandamento C, mostraram heterocromatina constitutiva na região terminal do braço curto de todos os pares autossômicos e cromossomos sexuais X_1 e X_2 , com exceção do par 5. Além disso, blocos de heterocromatina foram visualizados na região terminal do braço longo dos pares 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e cromossomo sexual X_2 . Bandas adicionais foram localizadas na região intersticial do braço curto de ambos os elementos do par 4. O cromossomo sexual Y apresentou-se inteiramente heterocromático. Os blocos de heterocromatina presentes no braço curto do par 10, foram coincidentes com a região de constrição secundária (Figura 4a-b). Além do padrão de banda C observado em células mitóticas, o estudo de células meióticas permitiu identificar blocos adicionais de heterocromatina na região pericentromérica

do cromossomo sexual X_2 . O cromossomo sexual Y mostrou marcação intensa, sendo facilmente identificado em espermátócitos diplotênicos (Figura 4c-d). Em metáfases II, foi possível confirmar que as regiões bandas C positivas do par 1 eram mais tênues quando comparadas com aquelas dos outros cromossomos (Figura 4e-f).

Misionella mendensis

A análise do cariótipo de indivíduos macho de *M. mendensis* mostrou o número diploide $2n=21$, SCS do tipo X_1X_2Y , e todos os cromossomos com morfologia metacêntrica, com exceção daqueles do par 1, que se apresentaram submetacêntricos (Figura 5a). Com relação ao tamanho, os autossomos decresceram gradualmente, os cromossomos sexuais X_1 e X_2 foram identificados como os maiores elementos do complemento, enquanto o cromossomo Y constituiu o menor elemento do cariótipo. Adicionalmente, constrições secundárias foram localizadas na região intersticial do braço longo dos cromossomos dos pares 1 e 2. O estudo de células meióticas confirmou o número diploide e o tipo de SCS estabelecido para esta espécie (Figura 5b-d). Em diplóteno, os bivalentes autossômicos exibiram um quiasma terminal ou intersticial, e os cromossomos sexuais estavam associados em uma configuração trivalente (Figura 5b), semelhante àquela verificada em *K. hibernalis*. Núcleos em metáfase II mostraram $n=9+X_1X_2$ e $n=9+Y$ (Figura 5c-d), evidenciando a segregação balanceada de todos os cromossomos.

Células mitóticas embrionárias sequencialmente coradas com Giemsa e impregnadas pelo íon prata, revelaram 6 RONS na região terminal dos braços curtos dos cromossomos dos pares 1, 3 e 5 (Figura 6a-b). Nesta espécie, as RONS não

foram coincidentes com as regiões de constrição secundária. Metáfases mitóticas submetidas ao bandamento C mostraram heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos; bandas adicionais foram verificadas na região terminal do braço curto dos pares 5 e 8 (Figura 6c-d). A heterocromatina terminal localizada no par 5 foi coincidente com a RON.

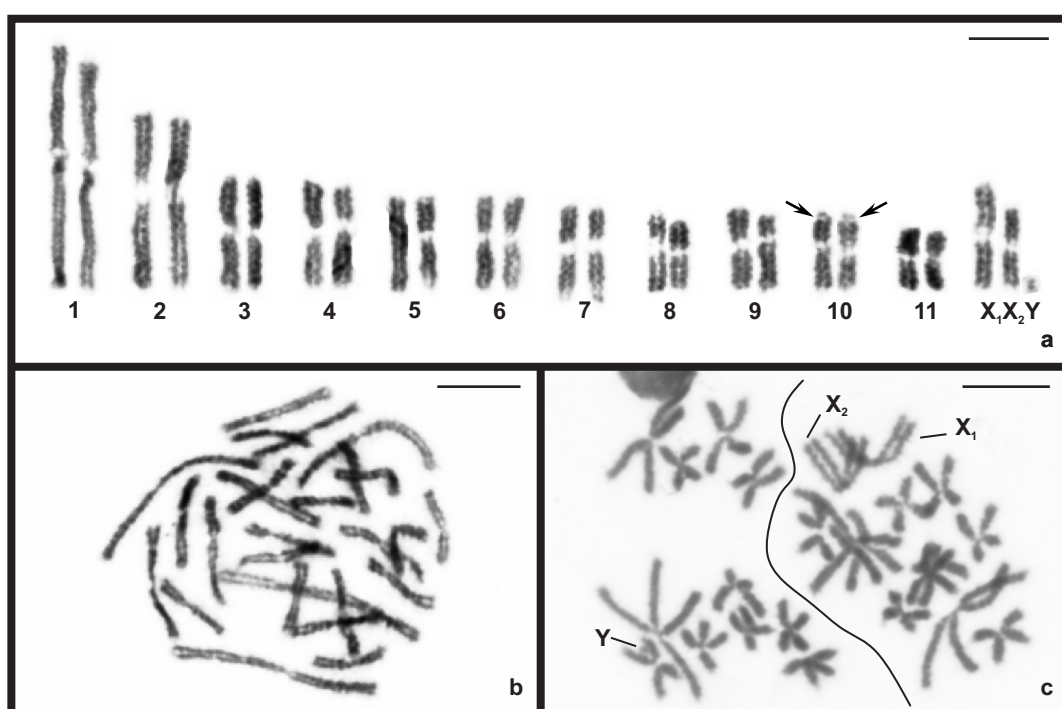


Figura 1. Células mitóticas (a-b) e meióticas (c) de *Kukulcania hibernalis* coradas com Giemsa. (a) Cariótipo, $2n\sigma=25=22+X_1X_2Y$, com cromossomos metacêntricos. Note o heteromorfismo quanto à morfologia dos cromossomos do par 9 (meta/submetacêntricos). As setas indicam constrição secundária. (b) Metáfase oogonial com $2n=26$. (c) Metáfases II, exibindo $n=11+Y$ (polo esquerdo) e $n=11+X_1X_2$ (polo direito). Escala= $10\mu m$.

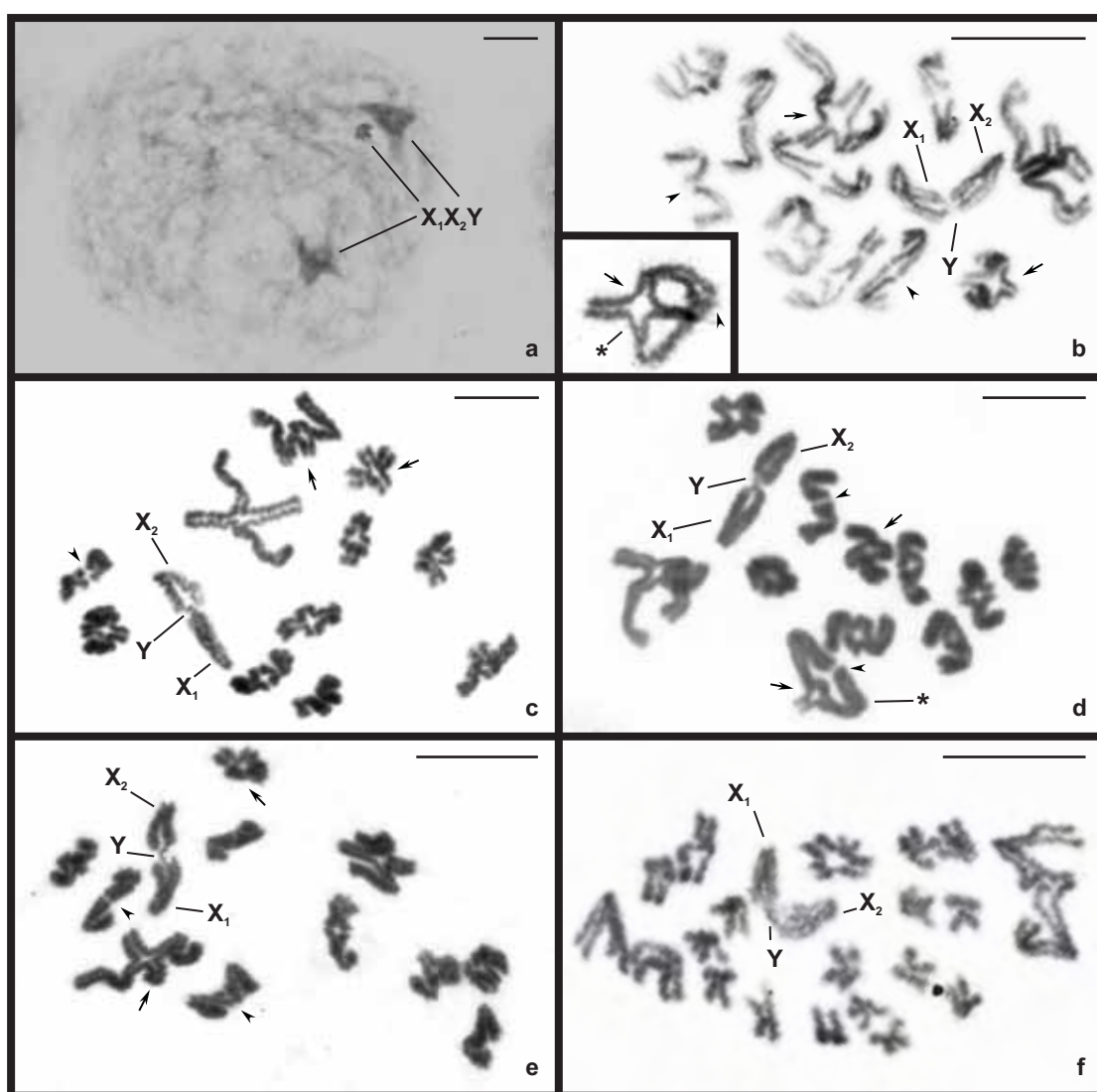


Figura 2. Células testiculares de *Kukulcania hibernalis*, coradas com Giemsa. (a) Núcleo profásico I, revelando a heteropícnose positiva dos cromossomos sexuais. (b-f) Diplótenos com $11II+X_1X_2Y$, mostrando bivalentes com quiasma intersticial (seta) e quiasma terminal (cabeça de seta). O destaque em **b** e o asterisco evidenciam um bivalente biquiasmático. Note a associação trivalente dos cromossomos sexuais X_1X_2Y . Escala=10 μ m.

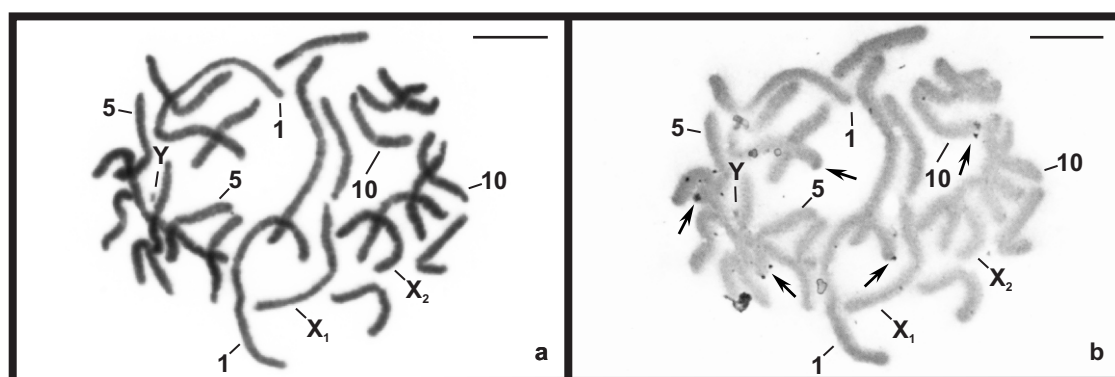


Figura 3. Metáfase mitótica de *Kukulcania hibernalis* macho com $2n\sigma=25=22+X_1X_2Y$, corada com Giemsa (a) e impregnada pelo íon prata (b). Observe as regiões organizadoras de nucléolo (setas) localizadas na região terminal dos pares 1, 5 e 10. Escala=10 μ m.

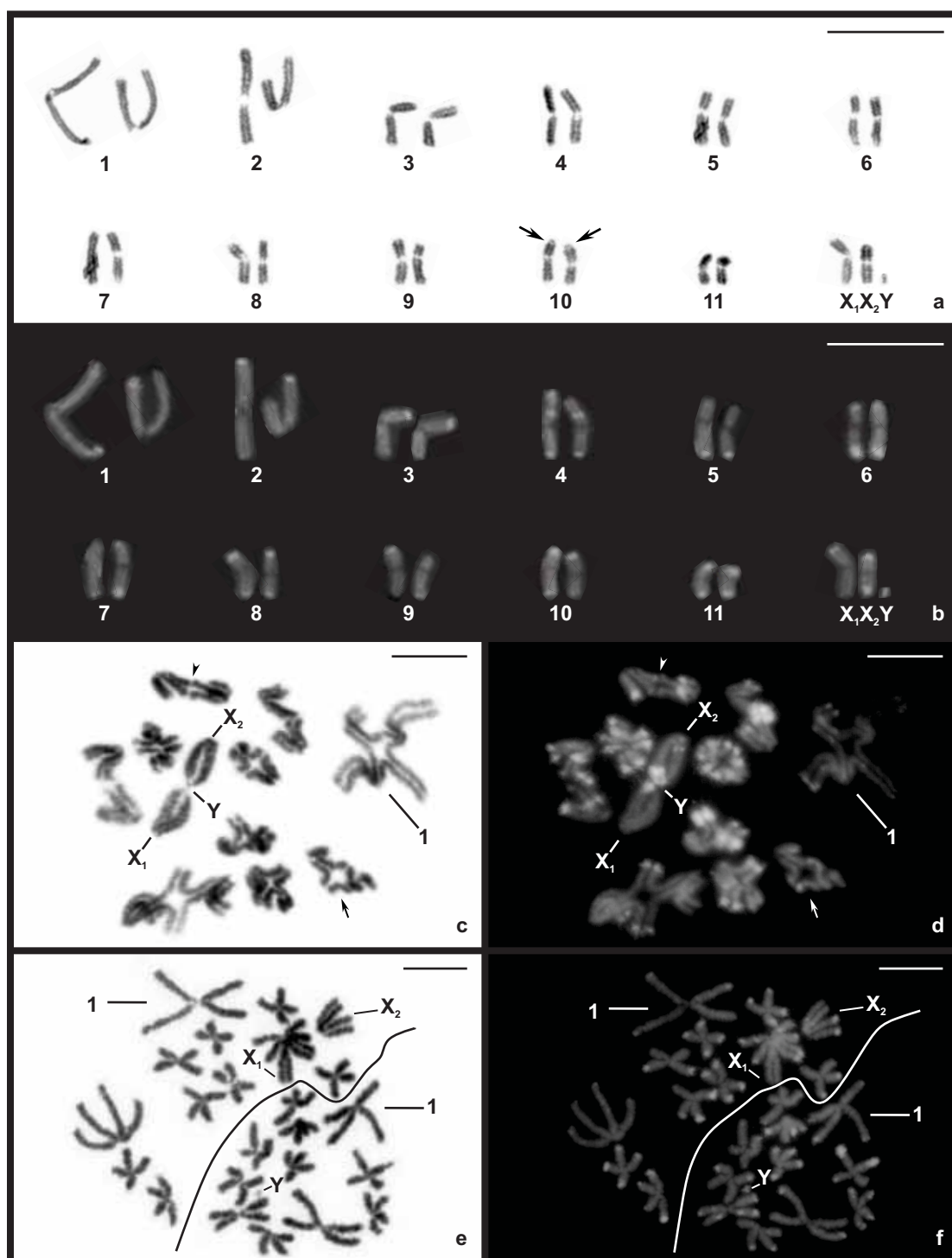


Figura 4. Células testiculares de *Kukulcania hibernalis* coradas com Giemsa (a, c, e) e submetidas ao bandamento C (b, d, f). (a-b) Cariótipo com $2n\sigma=25=22+X_1X_2Y$. Notar a predominância de heterocromatina constitutiva nas regiões terminais dos cromossomos. As setas grandes em a indicam constrição secundária. (c-d) Diplóteno, com $11II+X_1X_2Y$, evidenciando o cromossomo Y totalmente heterocromático. O bivalente do par 1 mostra marcações tênues de heterocromatina constitutiva. Seta pequena=quiasma intersticial; cabeça de seta=quiasma terminal. (e-f) Metáfases II com $n=11+X_1X_2$ (polo esquerdo) e $n=11+Y$ (polo direito). Notar marcação de banda C pouco intensa nos cromossomos do par 1. Escala=10µm.

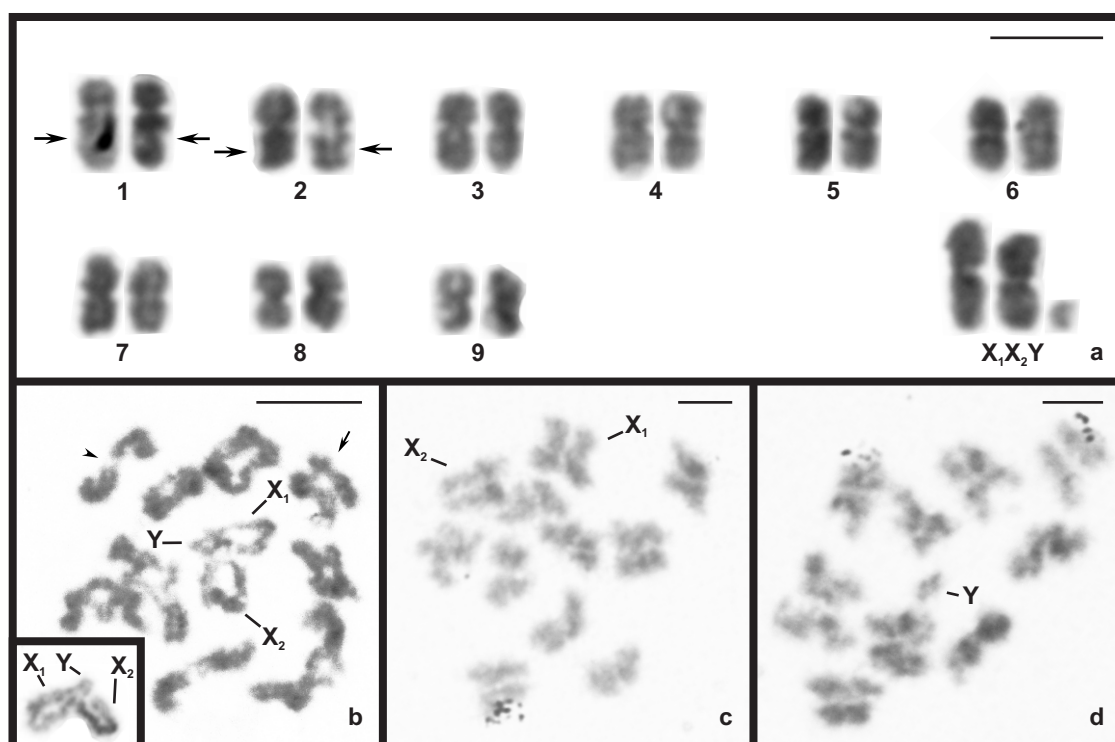


Figura 5. Células de *Misionella mendensis* macho, coradas com Giemsa. **(a)** Cariótipo, $2n^\sigma = 21 = 18 + X_1X_2Y$ e cromossomos com morfologia predominantemente metacêntrica. As setas grandes apontam para regiões de constrição secundária. **(b)** Diplóteno, exibindo $9II + X_1X_2Y$ e bivalentes autossômicos com um quiasma terminal (cabeça de seta) ou intersticial (seta pequena). Em destaque o trivalente sexual X_1X_2Y . **(c-d)** Metáfases II com $n = 9 + X_1X_2$ e $n = 9 + Y$, respectivamente. Escala = $10\mu m$.

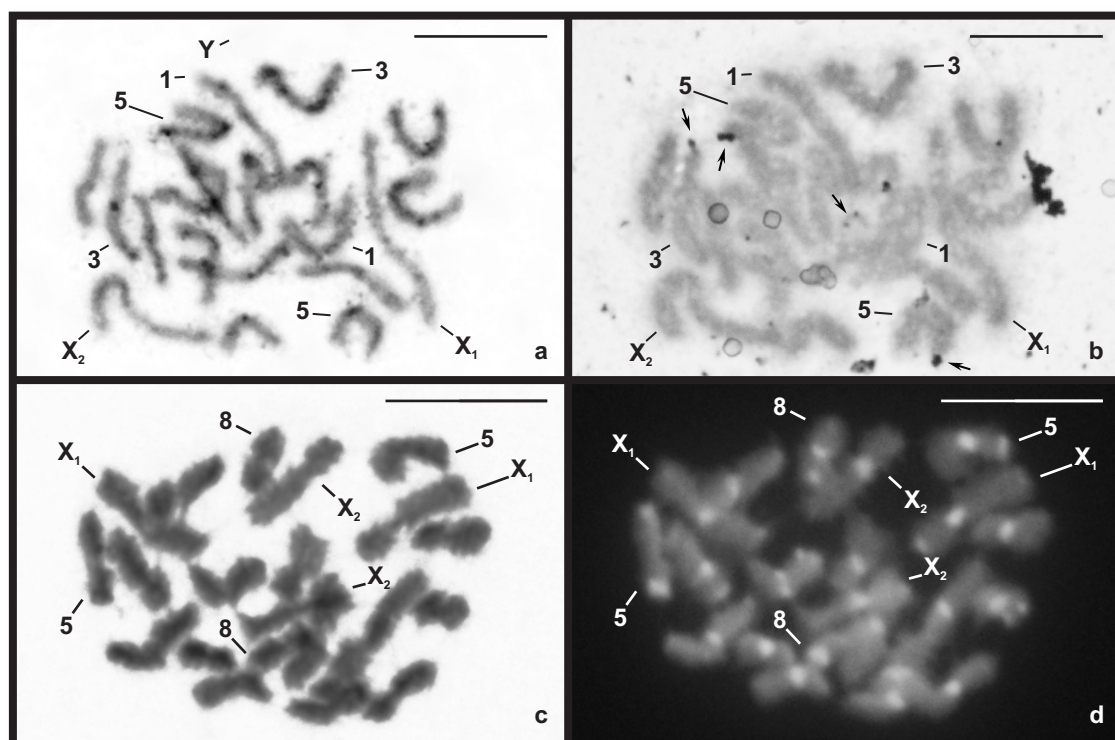


Figura 6. Células mitóticas de embriões de *Misionella mendensis* convencionalmente coradas (**a, c**), impregnada pelo íon prata (**b**) e submetida ao bandamento C (**d**). (**a-b**) Metáfase com $2n\sigma = 21 = 18 + X_1X_2Y$, revelando regiões organizadoras de nucléolo (seta) na região terminal dos pares 1, 3 e 5. Na figura **b** o cromossomo Y não está evidente. (**c-d**) Metáfase com $2n\varphi = 22 = 18 + X_1X_1X_2X_2$, mostrando heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos. Observe blocos heterocromáticos adicionais nos pares 5 e 8. Escala=10µm.

DISCUSSÃO

As características cariotípicas observadas em *M. mendensis* são inéditas para Filistatidae e o $2n♂=21$ corresponde ao menor número diploide já descrito para a família. Com relação a *K. hibernalis*, o número de cromossomos autossômicos encontrado na amostra analisada no presente trabalho, é similar àquele previamente descrito para uma população da Argentina (Rodríguez Gil et al., 2002). Contudo, estas duas populações diferiram quanto ao tipo de SCS, isto é, X_1X_2Y para a população do Brasil e X_1X_20 para a amostra da Argentina. A morfologia cromossômica meta/submetacêntrica é comum para todas às espécies de Filistatidae, sendo também a mais frequente para as aranhas do grupo Haplogynae (Araujo et al., 2013).

Na subfamília Filistatinae existem registros citogenéticos para duas espécies, *Filistata insidiatrix*, com $2n=30+X_1X_2Y$ (Král et al., 2006) e *Kukulcania hibernalis*, com $2n= 22+X_1X_20$ (Rodríguez Gill et al., 2002) e $2n=22+X_1X_2Y$ (presente trabalho). Em Prithinae, a única espécie descrita citogeneticamente foi *Misionella mendensis*, que apresentou $2n=18+X_1X_2Y$. Estes resultados mostram que os números diploides mais altos ocorrem na subfamília Filistatinae, no entanto, o SCS do tipo X_1X_2Y parece ser uma característica comum para as espécies das duas subfamílias. Desta forma, é possível sugerir que a diferenciação cariotípica nesta família envolveu somente os cromossomos do conjunto autossômico através da diminuição do número diploide das espécies basais (subfamília Filistatinae) para as derivadas (subfamília Prithinae). A presença do SCS do tipo X_1X_2Y em três gêneros distintos, agrupados em duas subfamílias, indica que este tipo de sistema representa uma característica compartilhada em Filistatidae. Adicionalmente, este sistema pode corresponder a uma condição ancestral para Haplogynae, uma vez que Filistatidae é considerada

basal em relação as outras famílias deste clado. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de que o sistema do tipo X_1X_2Y também foi descrito para outras espécies de famílias derivadas de haploginas e está ausente em Mygalomorphae e Entelegynae (Araujo et al., 2013). Além disso, o comportamento similar dos cromossomos X_1 , X_2 e Y durante a meiose, nas diferentes espécies de haploginas caracterizadas, aponta para uma origem comum deste tipo de SCS para o grupo (Silva, 1988; Oliveira et al., 1996; Oliveira et al., 1997; Rodríguez Gil et al., 2002; Silva et al.; 2002; Král et al., 2006).

A diferença quanto aos tipos de SCS descritos para as populações de *K. hibernalis* da Argentina e do Brasil, X_1X_20 e X_1X_2Y , respectivamente, pode estar relacionada a uma variação interpopulacional, a qual já foi observada para outras espécies de aranhas haploginas, como, por exemplo, *Loxosceles reclusa* (X_1X_20 e $?Y$) e *Scytodes globula* ($X0$ e X_1X_20) (Diaz e Saez, 1966; Hetzler, 1979; Tugmom et al., 1990; Rodríguez Gil et al., 2002; Araujo et al., 2008). Alternativamente, o tamanho diminuto do cromossomo sexual Y pode ter dificultado a identificação e interpretação deste tipo de sistema.

Informações citogenéticas referentes à identificação de regiões cromossômicas específicas são escassas em aranhas, sendo que somente cerca de 50 e 30 espécies foram caracterizadas quanto à distribuição das RONS e heterocromatina constitutiva, respectivamente (Araujo et al., 2012). Em Mygalomorphae e Araneomorphae, as RONS estão localizadas predominantemente na região terminal, de um a três pares autossômicos. Contudo, na linhagem Haplogynae, as espécies portadoras dos sistemas $X0$ e XY apresentaram RONS sobre os cromossomos autossômicos e cromossomo sexual X , ou somente sobre o cromossomo X (Král et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Araujo et al., 2008).

Adicionalmente, a única espécie portadora do SCS do tipo X_1X_2Y investigada quanto à distribuição das RONS, *Hypochilus pococki* (Hypochilidae) com $2n=29$, mostrou dois pares de cromossomos autossômicos impregnados pelo íon prata (Král et al., 2006).

As duas espécies de Filistatidade, analisadas no presente trabalho, embora tenham exibido uma diferença quanto ao número diploide, apresentaram um padrão de distribuição e marcação das RONS similar, uma vez que em ambas foram identificadas RONS na região terminal de três pares autossômicos, sendo estas coincidentes nos pares 1 e 5. A marcação das RONS em elementos autossômicos não parece constituir condição exclusiva de Filistatidae, mas poderia representar uma característica compartilhada em espécies de Haplogynae com o SCS do tipo X_1X_2Y . Desta forma, um esforço para localizar as RONS em outras espécies cujos SCS do tipo X_1X_2Y já foi identificado, como, por exemplo, *Drymusa capensis* (Drymusidae), *Filistata insidiatrix* (Filistatidae), *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles spinulosa* (Sicariidae), *Pholcus phalangioides* e *Spermophora senoculata* (Pholcidae) (Araujo et al., 2013) poderia ajudar a confirmar esta hipótese.

De forma geral em aranhas, as regiões de heterocromatina constitutiva exibem um padrão de distribuição similar entre os elementos autossômicos e sexuais, ocorrendo na região pericentromérica dos cromossomos (Araujo et al., 2012). Nas espécies de Filistatidae aqui estudadas, uma diferença quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi observada, considerando que em *K. hibernalis* houve a predominância de marcação na região terminal dos cromossomos enquanto em *M. mendensis*, o padrão de marcações foi de blocos pericentroméricos. Esta variação pode ser decorrente dos rearranjos que alteraram

os números diploides verificados nestas espécies. Levando-se em conta a distribuição das regiões banda C positivas nos elementos do par 9 de *K. hibernalis*, é possível inferir que o heteromorfismo de morfologia observado entre os cromossomos do par 9 foi originado por rearranjos do tipo deleção, uma vez que o elemento submetacêntrico não mostrou marcação de heterocromatina na região terminal do braço curto. Em espécies de Haplogynae com SCS do tipo X_1X_2Y , o cromossomo Y apresenta-se completamente heterocromático. Este padrão foi observado em *K. hibernalis* e *M. mendensis*, assim como em espécies pertencentes a outras famílias, por exemplo, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* (Sicariidae) e *Pholcus phalangioides* (Pholcidae) (Silva et al., 2002; Král et al. 2006).

Embora as informações citogenéticas sejam restritas a somente três espécies de Filistatidae, os resultados disponíveis mostram que a família apresenta uma grande diversidade cariotípica, relacionada principalmente ao número de autossomos e a distribuição da heterocromatina constitutiva. Adicionalmente, a diversidade na constituição cariotípica parece ser uma característica comum para espécies de haploginas basais (Filistatidae) e derivadas, diferindo do padrão cariotípico uniforme que é verificado em Entelegynae, de uma forma geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, D.; Cella, D.M.; Brescovit, A.D. 2005: Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. *Brazilian Journal of Biology*. 65(2): 193-202.

Araujo, D.; Rheims, C.A.; Brescovit, A.D.; Cella, D.M. 2008: Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46(2): 89-95.

Araujo, D.; Schneider, M.C; Paula-Neto, E; Cella, D.M. 2012: Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. *InTech – Open Access Publisher*. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/sex-chromosomes-and-meiosis-of-spiders-a-review>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

Araujo, D.; Schneider, M.C.; Paula-Neto, E.; Cella, D.M. 2013. The spider cytogenetic database, versão 1.0. Disponível em: <www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase>. Acesso em: 30 mar. 2013.

Coddington, J.A. & Levi, H.W. 1991: Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 565-592.

Diaz, M.O. & Saez, F.A. 1966: Karyotypes of South-American Araneida. *Memórias do Instituto Butantan*. 33(1): 153-154.

Gray, M.R. 1995: Gray, M.R.: Morphology and relationships within the spider family Filistatidae (Araneae: Araneomorphae). *Records of the Western Australian Museum*. Supplement 52: 79-89.

Hetzler, S. 1979: Some studies of spider chromosomes. *American Arachnology*. 20: 20-20.

Howell, W.M. & Black, D.A. 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.

Král, J.; Musilová, J.; St'áhlavsky, F.; Rezác, M.; Akan, Z.; Edwards, R.L.; Coyle, F.A.; Almerje, C.R. 2006: Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae, Araneomorphae). *Chromosome Research*. 14: 859-880.

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

Oliveira, E.G.; Cella, D.M.; Brescovit, A.D. 1996: The karyotype of *Loxosceles gaucho* and *Ctenus ornatus* (Arachnida, Araneae, Sicariidae, Ctenidae). *Revista Brasileira de Genética*. 18: 128.

Oliveira, E.G.; Cella, D.M.; Brescovit, A.D. 1997: Karyotype of *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Arachnida, Araneae, Sicariidae). NeoX₁ NeoX₂ Y sex determination mechanism and NORs. *Revista Brasileira de Genética*. 20: 77.

Oliveira, R.M.; Jesus, A.C.; Brescovit, A.D.; Cella D.M. 2007: Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocyclus globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). *The Journal of Arachnology*.35: 293-306.

Platnick, N.I. 2013: The world spider catalog, versão 13.0. *American Museum of Natural History*. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

Ramírez, M.J. & Grismado, C.J. 1997: A review of the spider family Filistatidae in Argentina (Arachnida, Araneae), with cladistic reanalysis of filistatid genera. *Entomologica scandinavica*. 28: 319-349.

Rodríguez-Gil, S.G.; Mola, L.M.; Papeschi, A.G.; Scioscia, C.L. 2002: Cytogenetic heterogeneity in common Haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). *The Journal of Arachnology*. 30: 47-56.

Sakamoto, Y. & Zacaro, A.A. 2009: LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>. Acessado em 30 mar. 2013.

Silva, D. 1988: Estudio cariotípico de *Loxosceles laeta* (Araneae: Loxoscelidae). *Revista Peruana de Entomologia*. 31: 9-12.

Silva, R.W.; Klisiowicz, D.R.; Cella, D.M.; Mangili, O.C.; Sbalqueiro, I.J. 2002: Differential distribution of constitutive heterochromatin in two species of brown spider: *Loxosceles intermedia* and *L. laeta* (Araneae, Sicariidae), from the metropolitan region of Curitiba, PR (Brazil). *Acta Biologica Paranaense*. 31(1-4): 123-136.

Sumner, A.T. 1972: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 75: 304-306.

Tugmon, C.R.; Brown, J.D.; Horner, N.V. 1990: Karyotypes of seventeen USA spiders species (Araneae, Araneidae, Gnaphosidae, Loxoscelidae, Lycosidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae and Theridiidae). *The Journal of Arachnology*. 18: 41-48.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através da análise citogenética das seis espécies de aranhas estudadas no presente trabalho permitiu constatar:

- Em Mygalomorphae, além da variabilidade de número diploide previamente observada neste grupo, há também uma grande diversidade de tipos de sistema cromossômico sexual, uma vez que nas quatro espécies caracterizadas neste trabalho foram identificados dois sistemas inéditos para Araneae.

- Embora as espécies de migalomorfas aqui examinadas pertençam à mesma família, os sistemas cromossômicos sexuais XY_1Y_2 e $X_1Y_1+X_2Y_2$ parecem ter se originado de forma independente, embora a diferenciação de ambos os sistemas tenha ocorrido através de rearranjos envolvendo os cromossomos sexuais e os autossomos.

- A identificação precisa dos sistemas cromossômicos sexuais múltiplos de Mygalomorphae só foi possível através da investigação de células meióticas submetidas a colorações diferenciais (impregnação pelo íon prata e bandamento C), o que reforça a importância deste tipo de análise em outras espécies de aranhas.

- Em Filistatidae a diferenciação cariotípica está relacionada principalmente ao número diploide, uma vez que em espécies pertencentes a diferentes gêneros houve a manutenção do sistema cromossômico sexual do tipo X_1X_2Y .

- O sistema cromossômico sexual X_1X_2Y pode representar um caráter compartilhado para aranhas Haplogynae, pois ocorre em espécies filogeneticamente basais assim como em famílias derivadas, e os cromossomos sexuais exibem comportamento conservado durante a meiose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, D.; SCHNEIDER, M.C; PAULA-NETO, E; CELLA, D.M. 2012: Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. **InTech – Open Access Publisher**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/sex-chromosomes-and-meiosis-of-spiders-a-review>>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- ARAUJO, D.; SCHNEIDER, M.C.; PAULA-NETO, E.; CELLA, D.M. 2013. The spider cytogenetic database, versão 1.0. Disponível em: <www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- BOND, J. E., B. E. HENDRIXSON, C. A. HAMILTON; M. HEDIN. A reconsideration of the classification of the spider infraorder Mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. **PLoS One**, v. 7(6), p. e38753, 2012.
- CHRISTIAN A, MCNIEL E, ROBINSON J, DRABEK R, LARUE S, WALDREN C, BEDFORD J. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v82, p.172–179, 1998.
- CODDINGTON, J.A., LEVI, H.W. Systematics and evolution of spiders (Araneae). **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.22, p. 565-92, 1991.
- DATTA, S.N., CHATTERJEE, K. Chromosomes and sex determination in 13 araneid spiders of North-Eastern India. **Genetica**, v. 76, p. 91-9, 1988.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-15, 1980.

- KRÁL, J. et al. Evolution of the karyotype and sex chromossome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). **Chromossome Research**, v. 14, p. 859-80, 2006.
- KRÁL, J. et al. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in Mesothelid and Mygalomorph spiders., 18th International Congress of Arachnology, Siedlce, Poland, p. 231, 2010. **Book of Abstracts**.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-20, 1964.
- MADDISON, W.P. XXXY sex chromosomes in males of the jumping spiders genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae). **Chromosoma**, v. 85, p. 23-37, 1982.
- PAINTER, T.S. Spermatogenesis in spiders. **Zool. Jahrb. Anat.**, v. 38, p. 509-76, 1914.
- PLATNICK, N.I. et al. Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). **Americam Museum Novitates**, v. 3016, p. 1-73, 1991.
- PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 13.5. American Museum of Natural History. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- POSTIGLIONI, A., BRUM-ZORRILLA, N. Karyological studies on Uruguayan spiders. II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae). **Genetica**, v. 56, p. 47-53, 1981.
- REZAC, M., KRÁL, I., MUSILOVÁ, J., PEKÁR, S. Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). **Hereditas**, v. 143, p. 123-9, 2006.

- ROWELL, D.M. Complex sex-linked fusion heterozygosity in the Australian huntsman spider *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). **Chromosoma**, v. 93, p. 169-76, 1985.
- ROWELL, D.M. Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. **Genetica**, v. 80, p. 139-57, 1990.
- SAKAMOTO, Y. & ZACARO, A.A. 2009: LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>. Acessado em 30 mar. 2013.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-6, 1972.
- SUZUKI, S. Cytological studies in spiders. I. A comparative study of the chromosomes in the family Argiopidae. **J. Sci. Hiroshima Univ.**, v. 12, p. 67-98, 1951.
- SUZUKI, S. Cytological studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. **J. Sci. Hiroshima Univ.**, v. 15, p. 23-136, 1954.
- WALLACE, L.B. The spermatogenesis of *Agalena naevia*. **Biol. Bull.**, v.17, p. 120-60, 1909.
- WHITE, M.J.D. **Animal Cytology and Evolution**. 3. ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. 961p.