
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EMYGDIO DE PAULA NETO

***NEPHILA CLAVIPES* E *NEPHILA SEXPUNCTATA*
(ARANEAE, ARANEOMORPHAE, NEPHILIDAE): CARIÓTIPO,
HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA E REGIÃO
ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO**

EMYGDIO DE PAULA NETO

NEPHILA CLAVIPES E *NEPHILA SEXPUNCTATA* (ARANEAE,
ARANEOMORPHAE, NEPHILIDAE): CARIÓTIPO,
HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA E REGIÃO
ORGANIZADORA DE NUCLEÓLO

Orientadora: Profa. Dra. Doralice Maria Cella

Co-orientadora: Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

595.44 Paula Neto, Emygdio de
P324n Nephila clavipes e Nephila sexpunctata (Araneae, Araneomorphae, Nephilidae): cariótipo, heterocromatina constitutiva e região organizadora de nucléolo / Emygdio de Paula Neto. - Rio Claro : [s.n.], 2011
28 f. : il., figs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Doralice Maria Cella
Co-Orientador: Marielle Cristina Schneider

1. Aracnídeo. 2. Citogenética. 3. Cromossomos. 4. Diferenciação cariotípica. 5. Evolução. 6. Sistema cromossômico sexual. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico este trabalho ao meu pai Emygdio de Paula Filho (*in memoriam*), a minha mãe Marcia Aparecida Pimentel de Paula e minha irmã Suzana Pimentel de Paula. Vocês me oferecem amor incondicional, além de renunciar seus próprios sonhos, para que eu possa alcançar os meus. Hoje, este Trabalho de Conclusão de Curso, é a testemunha atemporal do amor, carinho e dedicação que um dia tentei lhes retribuir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida.

In memoriam aos meus avós paternos, Emygdio de Paula e Iracema Camargo de Paula, e meus avós maternos Jurandyr Pimentel e Carolina Maria Rampim Pimentel. Vocês criaram seus filhos com tanta dedicação e carinho, proporcionando a este seu neto os pais mais fantásticos que um filho poderia desejar. A saudade é imensa, mas as boas memórias deixaram marcas indeléveis.

À minha família. Meu pai Emygdio de Paula Filho (*in memoriam*), minha mãe Marcia Aparecida Pimentel de Paula e minha irmã Suzana Pimentel de Paula. Sou eternamente grato pelo carinho, compreensão e paciência que têm para comigo. Saibam que este Trabalho representa uma pequena vitória, no futuro que eu desejo para nós.

À minha orientadora Profa. Dra. Doralice Maria Cella. Agradeço por ter acreditado em mim desde sempre, e ter me incentivado em todos os momentos. Penso que nem se eu aprendesse a transformar cromossomos em ouro, seria o suficiente para retribuir o quanto sou grato por dividir seus conhecimentos e experiências comigo. Não vejo precedentes para a confiança e credibilidade que você deposita em minha pessoa.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider. Você me ensinou, e ensina, desde uma simples tabulação em textos até os mais complicados protocolos de nossas pesquisas. Sinceramente, penso ser muito pouco um simples agradecimento. Pretendo agradecer com sucesso profissional, com resultados bons. Acredito que esse seja o agradecimento mais justo que eu lhe poderei oferecer um dia. Por hora saiba que muito lhe admiro, e descaradamente copio, como profissional e como pessoa.

Ao Prof. Dr. Douglas de Araujo. Você me incentivou e auxiliou talvez no período mais árduo do trabalho: o começo. Sou grato pelo companheirismo, ensinamentos e descontração dos momentos que passamos juntos.

Aos MSc. Edson Lourenço da Silva e Msc. Simone Lilian Gruber, pelo tempo dedicado à correção deste TCC, bem como as inestimáveis críticas e sugestões elaboradas. Todos esses elementos tornaram este trabalho mais rico, sem dúvida.

Aos professores(a)s Dra. Ana Luiza Brossi Garcia, Dr. Claudio José Von Zuben, Dra. Doralice Maria Cella e Dr. Fernando Carlos Pagnocca por terem me orientado como monitor em diferentes disciplinas. Todo o conhecimento compartilhado, bem como a interação com os alunos ingressantes foi fundamental para aprofundar minhas leituras e minha formação profissional e pessoal.

Ao grande companheiro de estágio André Marsola Giroti. Compartilhamos diversos tipos de situações, das boas e das ruins. Não há um dia em que eu não sinta saudades até das malditas coletas de madrugada no brejo. É bom saber que construímos uma amizade sólida, temos um comprometimento profissional mútuo e

juntos com o Danilo Guarda, formamos o curso de “Biologia de Aranhas” mais famoso do Brasil!

Aos técnicos dos Laboratórios do Departamento de Biologia da UNESP – Rio Claro, por auxiliarem no bom andamento das diversas atividades que desenvolvi.

Aos funcionários da Biblioteca da Universidade, por terem paciência com as minhas inúmeras dúvidas sobre pesquisas bibliográficas.

Aos demais funcionários da UNESP – Rio Claro, por possibilitarem a utilização do Campus em sua plenitude.

Aos queridos amigos da Patota. Anderson Benine Belezia, Bruno Schüller da Gama, Cassiano Ricardo Bortolin, Danilo Belucci, Diego José Basso Pigossi, Gabriel Carvalho da Cunha, Jonas Pedro, Kleber Cais, Marcel Caritá Portela, Rafael Scopinho Pancher, Rodrigo Teciano dos Santos e Vitor Carlos Coletta. Agradeço por terem me alegrado muitas vezes, e por compartilhar momentos difíceis comigo.

Ao meu inesquecível amigo Bruno Schüller da Gama. Dizer que você é meu melhor amigo seria pouco. Por isso quero agradecer cada café tomado junto, cada riso proporcionado, cada oportunidade de conversa que temos. Você não sabe como me faz bem saber que eu tenho alguém como você por perto. Obrigado por estar ao meu lado, sempre!

Ao querido Marcel Caritá Portela. Faz falta conversar contigo sem ter de me preocupar com o horário. Você é uma inspiração para as minhas atividades, principalmente relacionadas à Licenciatura. Obrigado por compartilhar um pouco de suas vivências.

Ao Roberto Baruel Júnior, também conhecido como “macaco”. Você é quase um cúmplice. Todo o espaço dessas folhas seria pouco para lhe agradecer. No entanto, vou agradecer por ter esse coração enorme e por dividir um pouco de toda essa alegria em viver comigo.

Aos meus colegas de classe do curso de Ciências Biológicas C.B.N. – 2006. Obrigado por estimularem um convívio equilibrado e prazeroso.

Ao amigo que fiz na Universidade, mas que levarei para além dos muros dela. Lorenzo Eugene Robert Pietro Paolo Lodovico Dias Blattlin Briganti, o grande “Dom”. Agradeço por tornar cada dia de aula um evento engraçado, no mínimo. Isso ajudou muito a vencer as dificuldades, nos diversos momentos de dúvida. Todas as vezes em que precisei você sempre esteve disposto a fazer algo além do trivial. Nos dias de hoje, uma amizade assim é cada vez mais rara.

Aos amigos de pescaria Gilberto Aparecido Villares Júnior e Leandro Muller Gomiero. Faz falta pescar com vocês, hein? Obrigado por fazerem até o café da cantina ter mais graça.

Se o melhor vem por último, não poderia deixar de agradecer minha namorada Lorayne Pereira Bortolin. Você tem uma paciência enorme, além de ser

compreensiva com a importância que a Universidade tem em minha vida. A lembrança de cada abraço, beijo e carinho seu me fez continuar, sabendo que existe alguém que me quer muito bem no final da jornada. Além disso, você me agüenta todo santo dia, com minhas manias, birras, chatices e ainda diz que me ama. Tendo uma namorada assim, eu tenho mesmo é que agradecer!

“Mas todas as frustrações e todos os esforços monótonos, repetitivos, tornam-se insignificantes diante da alegria pura de descobrir algo novo – e esse prazer pode ser saboreado quase todos os dias quando também se ama as pequenas coisas. Dizer: “Nós descobrimos isso; nós compreendemos isso; nós conseguimos extrair sentido e ordem da confusão da natureza.” Pode existir recompensa maior?”.

Stephen Jay Gould (1990)

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO.....	8
2. INTRODUÇÃO.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSSÃO.....	18
7. CONCLUSÕES.....	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
9. ANEXO.....	28

1. RESUMO

As espécies de *Nephila* estão incluídas na família Nephilidae que pertence ao grupo das aranhas Entelegynae, o qual é considerado filogeneticamente derivado em relação aos outros grupos da ordem Araneae. Análises citogenéticas realizadas nas aranhas Entelegynae com técnicas de coloração convencional, têm mostrado que a maioria das espécies possui uniformidade cariotípica principalmente em relação a morfologia telo-acrocêntrica dos cromossomos e sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$. Além disso, estas análises têm demonstrado que algumas famílias de Entelegynae também possuem uniformidade cariotípica concernente ao número diplóide de cromossomos na maioria das suas espécies. Por outro lado, o emprego adicional de técnicas de coloração diferencial de regiões cromossômicas específicas em alguns representantes de Entelegynae têm revelado características que podem ser usadas para determinar os mecanismos envolvidos na evolução cromossômica e na diferenciação cariotípica de espécies relacionadas. Contudo, poucas espécies de Entelegynae tiveram seus cariótipos analisados com técnicas de coloração diferencial. O Brasil possui aproximadamente 4.000 espécies de Araneae descritas taxonomicamente; entretanto apenas cerca de 20 destas foram analisadas do ponto de vista citogenético. Considerando estas informações, o objetivo deste trabalho foi investigar o cariótipo de duas espécies de *Nephila*, *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata*, com técnicas de coloração convencional e diferencial para determinar o número diplóide, a morfologia cromossômica, o tipo de SCS, e o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (bandas C) e das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) ativas, e comparar os dados obtidos com aqueles de espécies relacionadas, para estabelecer os mecanismos de evolução cromossômica e diferenciação cariotípica. Ambas as espécies de *Nephila* mostraram $2n=24=22+X_1X_20$ nos machos e $2n=26=22+X_1X_1X_2X_2$ nas fêmeas, com cromossomos telo-acrocêntricos e cromossomos sexuais que correspondem aos maiores elementos do complemento. Nestas espécies, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva é pericentromérico. Nos cromossomos sexuais X_1 e X_2

de *Nephila sexpunctata*, a heterocromatina constitutiva parece estender-se da região pericentromérica para a região paracentromérica do braço longo. Bandas C adicionais foram detectadas nas regiões teloméricas dos pares 2, 7 e 11 de *Nephila clavipes*, dos pares 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 11 de *Nephila sexpunctata* e dos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de ambas as espécies. Nestas espécies, o número de cromossomos portadores de RONS foi 6 e 14 respectivamente, para machos de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata*. Alterações na quantidade de heterocromatina constitutiva através de rearranjos cromossômicos do tipo pequenas duplicações e/ou deleções e no número de cromossomos portadores de RONS por translocações parciais destas regiões foram os processos propostos para explicar a evolução cromossômica e a diferenciação cariotípica das espécies de *Nephila* examinadas neste trabalho.

Palavras-chave: citogenética, cromossomos, diferenciação cariotípica, evolução, sistema cromossômico sexual

OBSERVAÇÃO: Este Trabalho de Conclusão de Curso foi elaborado nos moldes de um artigo científico.

2. INTRODUÇÃO

Nephilidae é composta por 58 espécies, cuja distribuição geográfica é predominantemente subtropical (Kuntner et al., 2008; Platnick, 2010). Esta família inclui quatro gêneros: *Clitaetra* (seis espécies que ocorrem na África e Índia), *Herennia* (11 espécies distribuídas na Austrália, Filipinas, Indonésia, Índia e China), *Nephila* (37 espécies procedentes da Austrália, Nova Zelândia, Filipinas, Indonésia, Paquistão, Índia, China, Japão, Estados Unidos da América e América do Sul), *Nephilengys* (quatro espécies registradas para Austrália, África, Índia, China e América do Sul). Até os dias atuais, existem apenas três espécies de Nephilidae taxonomicamente registradas que ocorrem no Brasil (Platnick, 2010), *Nephila clavipes* (Linnaeus, 1767), *Nephila sexpunctata* Giebel, 1867 e *Nephilengys cruentata* (Fabricius, 1775).

Nephilidae constitui uma das famílias do grupo das aranhas Entelegynae. Este grupo inclui o maior número de representantes da ordem Araneae, os quais possuem uma ampla distribuição geográfica ao redor do mundo, e é considerado filogeneticamente derivado em relação aos outros grupos taxonômicos desta ordem, isto é, Haplogynae, Austrochiloidea, Paleocribelatae, Mygalomorphae, e Mesothelae (Coddington & Levi, 1991; Platnick et al., 1991; Platnick, 2010). As aranhas Entelegynae possuem o maior número de espécies analisadas do ponto de vista citogenético (aproximadamente 600 espécies) e apresentaram número diplóide de cromossomos variável entre $2n=\pm 52(X_1X_2O)$ a $2n=14=12+X_1X_2O$. Contudo, a maioria das espécies de Entelegynae tem exibido uma uniformidade cariotípica notável em relação a morfologia telo-acrocêntrica dos cromossomos e sistema cromossômico sexual (SCS) do tipo $X_1X_2O/X_1X_1X_2X_2$ (Araújo, 2007; Chemisquy et al., 2008). Adicionalmente, em algumas famílias de Entelegynae, a maioria das espécies também possui número diplóide de cromossomos uniforme, como, por exemplo, aquelas de Araneidae e Tetragnathidae, com $2n=24=22+X_1X_2O$, Theridiidae e Gnaphosidae, com $2n=22=20+X_1X_2O$, e Salticidae e Lycosidae, com $2n=28=26+X_1X_2O$ (Araújo, 2007; Chemisquy et al., 2008). Nas espécies de

Entelegynae, existem registros sobre a ocorrência de cromossomos submetacêntricos e metacêntricos; mas, estes são raros. Neste grupo, SCS do tipo X_0 , $X_1X_2X_3X_4$, $X_1X_2X_3X_4X_5$ e X_1X_2Y também foram descritos para algumas espécies; contudo, estes ocorreram em uma frequência muito baixa (Araujo, 2007).

Atualmente, estas uniformidades cariotípicas têm induzido os pesquisadores a realizarem suas análises citogenéticas predominantemente nos grupos de aranhas filogeneticamente basais, as quais mostraram uma diversidade surpreendente no número diplóide que variou de $2n=\pm 96(X_1X_2X_3X_4X_5)$ a $2n=7(X_0)$, na morfologia cromossômica que pode ser telo-acrocêntrica, submetacêntrica, ou metacêntrica, com exceção de duas famílias de Haplogynae, Dysderidae e Segestridae, cujos cromossomos são holocêntricos, e no tipo de SCS que pode ser X_0 , XY , X_1X_2Y , e $X_1X_2X_3X_4X_5$ nos machos (Araujo, 2007).

Apesar da alta uniformidade cariotípica registrada com coloração convencional para as aranhas Entelegynae, análises citogenéticas realizadas em algumas espécies deste grupo com técnicas de coloração diferencial que revelam regiões cromossômicas específicas, tais como regiões heterocromáticas constitutivas (HC) e regiões organizadoras de nucléolo (RONs), mostraram resultados que podem ser usados como características adicionais na determinação dos processos envolvidos na evolução cromossômica e na diferenciação cariotípica entre espécies relacionadas (Brum-Zorrilla & Postiglioni, 1980; Datta & Chatterjee, 1988; Rodríguez-Gil et al., 2007; Chemisquy et al., 2008). No entanto, poucas espécies de Araneae, em geral não relacionadas, tiveram seus cariótipos analisados com técnicas de coloração diferencial de regiões cromossômicas específicas, o que torna difícil o estabelecimento de propostas sobre a evolução cromossômica para este grupo (Brum-Zorrilla & Cazenave, 1974; Brum-Zorrilla & Postiglioni, 1980; Rowell, 1985, 1991; Datta & Chatterjee, 1988; Araujo et al., 2005a, 2008; Král et al., 2006; Král, 2007; Oliveira et al., 2007; Rodríguez-Gil et al., 2007; Chemisquy et al., 2008; Ramalho et al., 2008; Stavale et al., 2010).

O Brasil é uma das áreas com maior diversidade de aranhas no mundo, com aproximadamente 4.000 espécies descritas; porém, acredita-se que este número corresponde a apenas 30% da fauna existente (Brescovit, 1999). Destas, apenas cerca de 20 espécies foram descritas do ponto de vista citogenético (Oliveira et al., 1996, 1997; Silva et al., 2002; Araujo et al., 2005a, 2005b, 2008, 2010; Oliveira et al., 2007; Ramalho et al., 2008; Stavale et al., 2010).

3. OBJETIVOS

Levando-se em conta o baixo número de espécies de Entelegynae que tiveram seus cariótipos analisados com técnicas de coloração diferencial de regiões cromossômicas específicas e também o baixo número de representantes de Araneae da fauna brasileira que foram citogeneticamente analisados, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o cariótipo de duas espécies de *Nephila* (Anexo), *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata*, com técnicas de coloração convencional com Giemsa para determinar o número diplóide, morfologia cromossômica, e tipo de SCS, e coloração diferencial para verificar o padrão de distribuição das bandas C e das RONS. Além disso, os resultados obtidos foram comparados com aqueles de espécies taxonômica e filogeneticamente relacionadas para estabelecer os possíveis mecanismos envolvidos na evolução cromossômica e na diferenciação cariotípica destas espécies.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra citogeneticamente analisada de *Nephila clavipes* incluiu 28 indivíduos, isto é, 10 fêmeas adultas e 18 embriões (13 machos e 5 fêmeas) que foram coletados em Rio Claro (22°24'39"S, 47°33'39"W), estado de São Paulo (SP), Brasil, e aquela de *Nephila sexpunctata* foi composta de 14 indivíduos, sendo 6 fêmeas adultas e 8 embriões (3 machos e 5 fêmeas) capturados em Tupã (21°56'06"S, 50°30'50"W), SP, Brasil. Os exemplares adultos de ambas as espécies foram depositados na coleção do Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, SP, Brasil.

As preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas de gônadas de fêmeas e embriões de acordo com a técnica descrita por Webb et al. (1978), aumentando a concentração da solução de colchicina para 0,16%. Em ambas as espécies, várias tentativas foram feitas para obter preparações cromossômicas de gônadas de machos subadultos e adultos, mas nenhuma das preparações mostrou divisões celulares. Provavelmente, a espermatogênese nestas espécies ocorre em estágios iniciais do desenvolvimento pós-embrionário, como mencionado por Araujo et al. (2005a) para *N. cruentata* (Nephilidae).

Todas as preparações cromossômicas foram coradas convencionalmente com solução de Giemsa a 3%, durante 12 minutos, a temperatura ambiente. Algumas dessas foram submetidas a coloração seqüencial Giemsa - banda C e outras, Giemsa – impregnação pelo íon prata. A técnica de banda C empregada foi aquela estabelecida por Sumner (1972) e a impregnação pelo íon prata seguiu o procedimento de Howell & Black (1980). Os registros dos cromossomos mitóticos foram efetuados em um microscópio Olympus BX51, utilizando o software DP Controller. A classificação morfológica dos cromossomos foi realizada de acordo com a proposição de Levan et al. (1964).

5. RESULTADOS

A análise de metáfases mitóticas, coradas convencionalmente com Giemsa, de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* mostrou $2n=24$ em embriões machos e $2n=26$ em embriões fêmeas e células do ovário de indivíduos adultos, com todos os cromossomos telo/acrocêntricos. O cariótipo destas espécies revelou que os autossomos decrescem gradualmente em tamanho (Fig. 1). O uso de coloração convencional não proporcionou resultados suficientes que permitissem identificar os cromossomos sexuais, uma vez que estes não apresentaram características diferenciais quanto ao tamanho, grau de condensação e/ou coloração (picnose) em relação aos outros cromossomos do complemento. Contudo, os números diplóides encontrados na amostra analisada de ambas as espécies indicaram a ocorrência de SCS do tipo $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$. A utilização da técnica de obtenção de banda C possibilitou a identificação dos cromossomos sexuais, os quais corresponderam aos maiores elementos do cariótipo.

Em algumas metáfases mitóticas de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* em coloração convencional, regiões diferencialmente condensadas e coradas foram conspícuas na porção terminal do braço longo de alguns cromossomos. Estas regiões heteropicnóticas negativas, interpretadas como constrições secundárias (CS), ocorreram nos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila clavipes* (Fig. 1C) e nos pares autossômicos 1 e 2 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata* (Fig. 1F). Em ambas as espécies, estas regiões apareceram heteromórficas em relação a sua ocorrência e extensão entre células de um mesmo indivíduo e de indivíduos diferentes da mesma população. Em *Nephila clavipes*, estas regiões ocorreram em ambos os cromossomos X_1 e X_2 (Fig. 1C) ou em apenas um dos cromossomos sexuais ou, ainda, não eram identificáveis (Fig. 1A e C). Em *Nephila sexpunctata*, estas regiões mostraram variabilidade quanto a sua ocorrência e extensão semelhante aquela de *Nephila clavipes*; contudo, esta variabilidade envolveu os pares 1 e 2 e os cromossomos X_1 e X_2 (Fig. 1F).

As metáfases mitóticas de ambas as espécies submetidas a técnica de obtenção de bandas C exibiram heterocromatina constitutiva (HC) na região pericentromérica em todos os cromossomos (Fig. 1B, E e G). Nos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata*, a HC da região pericentromérica estende-se em direção a região paracentromérica do braço longo (Fig. 1E e G); este bloco heterocromático parece ser maior no cromossomo X_2 . Adicionalmente, em ambas as espécies, alguns cromossomos apresentaram banda C na região telomérica do braço longo. Estas bandas C adicionais eram tênues nos pares autossômicos 2, 7 e 11 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila clavipes* (Fig. 1B) e nos pares autossômicos 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 11 de *Nephila sexpunctata* (Fig. 1E e G); no entanto, essas foram proeminentes nos cromossomos X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata* (Fig. 1E e G). As bandas C teloméricas dos cromossomos sexuais de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* e dos pares autossômicos 1 e 2 de *Nephila sexpunctata* foram coincidentes com as regiões heteropicnóticas negativas detectadas em coloração convencional.

O emprego da técnica de impregnação pelo íon prata nas metáfases mitóticas revelou marcação típica de RON na região telomérica do braço longo nos pares 5 e 6 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila clavipes* (Fig. 2A-F) e nos pares 1, 2, 3, 5, 6 e 11 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata* (Fig. 2G-L). Assim, o número total de cromossomos carregadores de RONs em *Nephila clavipes* foi 6 e 8 para machos e fêmeas, respectivamente e em *Nephila sexpunctata* foi 14 e 16 para machos e fêmeas, respectivamente. Vale a pena ressaltar que os cromossomos X_1 e X_2 de *Nephila clavipes* e os pares autossômicos 1 e 2 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata* parecem possuir múltiplos sítios de RON em suas regiões teloméricas. Além disso, a extensão dos sítios múltiplos nos cromossomos sexuais de *Nephila clavipes* parece ser maior que aquela dos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata* (Fig. 2D, F, H, J e L).

A marcação telomérica das RONs parece coincidir com as regiões de constrições secundárias detectadas com coloração convencional e com as bandas C adicionais (teloméricas) nos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila clavipes* e nos pares 1 e 2 e cromossomos sexuais X_1 e X_2 de *Nephila sexpunctata*.

As RONs reveladas em ambas as espécies foram variáveis quanto a sua ocorrência e extensão de marcação. Consequentemente, diferentes tipos de

heteromorfismos foram observados entre células de um mesmo indivíduo e de indivíduos diferentes. Em *Nephila clavipes*, as RONS foram visualizadas em ambos os elementos cromossômicos ou em somente um elemento dos pares 5 e 6 e/ou em ambos ou em apenas um elemento dos cromossomos sexuais X_1 e X_2 (Fig. 2A-F). Assim, nesta espécie, o número de RONS ativas variou de 1 a 4 nos machos e de 2 a 7 nas fêmeas. Em *Nephila sexpunctata*, a variabilidade de marcação das RONS foi semelhante aquela de *Nephila clavipes* nos pares autossômicos 1, 2, 3, 5, 6 e 11 e nos cromossomos sexuais X_1 e X_2 (Fig. 2G-H); contudo, o número de RONS ativas por célula variou de 6 a 12 nos machos e de 3 a 13 nas fêmeas.

Figura 1 – Cariótipos de *Nephila clavipes* (**A - C**) e *Nephila sexpunctata* (**D - G**) em coloração convencional (**A, C, D, F**) e submetidos à técnica de banda C (**B, E, G**). **A, B, D e E**. Machos, $2n=24=22+X_1X_20$. **C, F e G**. Fêmeas, $2n=26=22+X_1X_1X_2X_2$. Os insertos em **C** mostram a variação em relação a presença e extensão da constrição secundária nos cromossomos sexuais. Em **F**, os insertos denotam a variação da constrição secundária nos pares 1 e 2 e cromossomos sexuais. **A-B, D-E, F-G**. Coloração seqüencial convencional - banda C. Cabeça de seta = constrição secundária. Seta grande = banda C paracentromérica no braço longo. Seta pequena = banda C na região terminal do cromossomo. Escala=10µm.

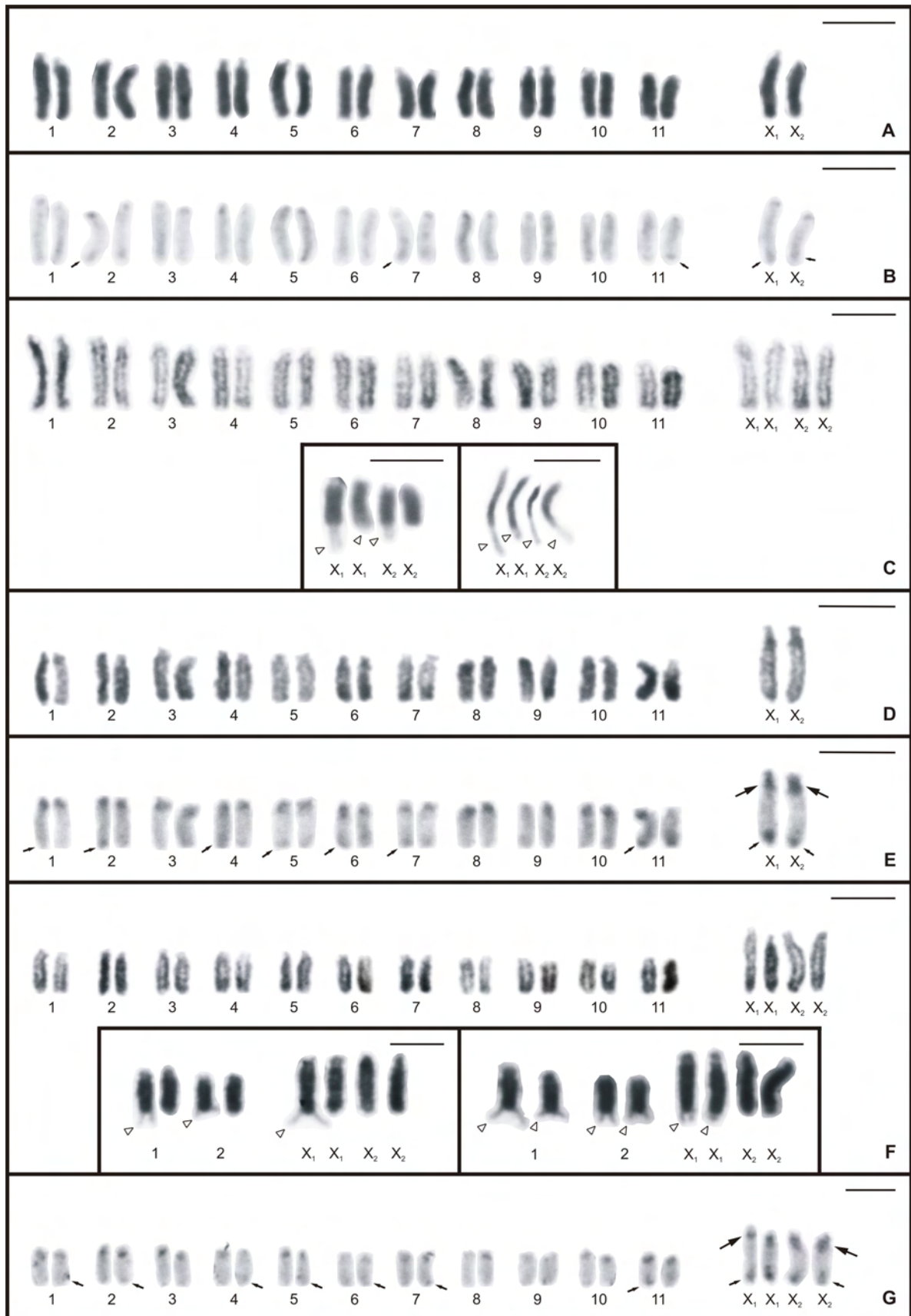
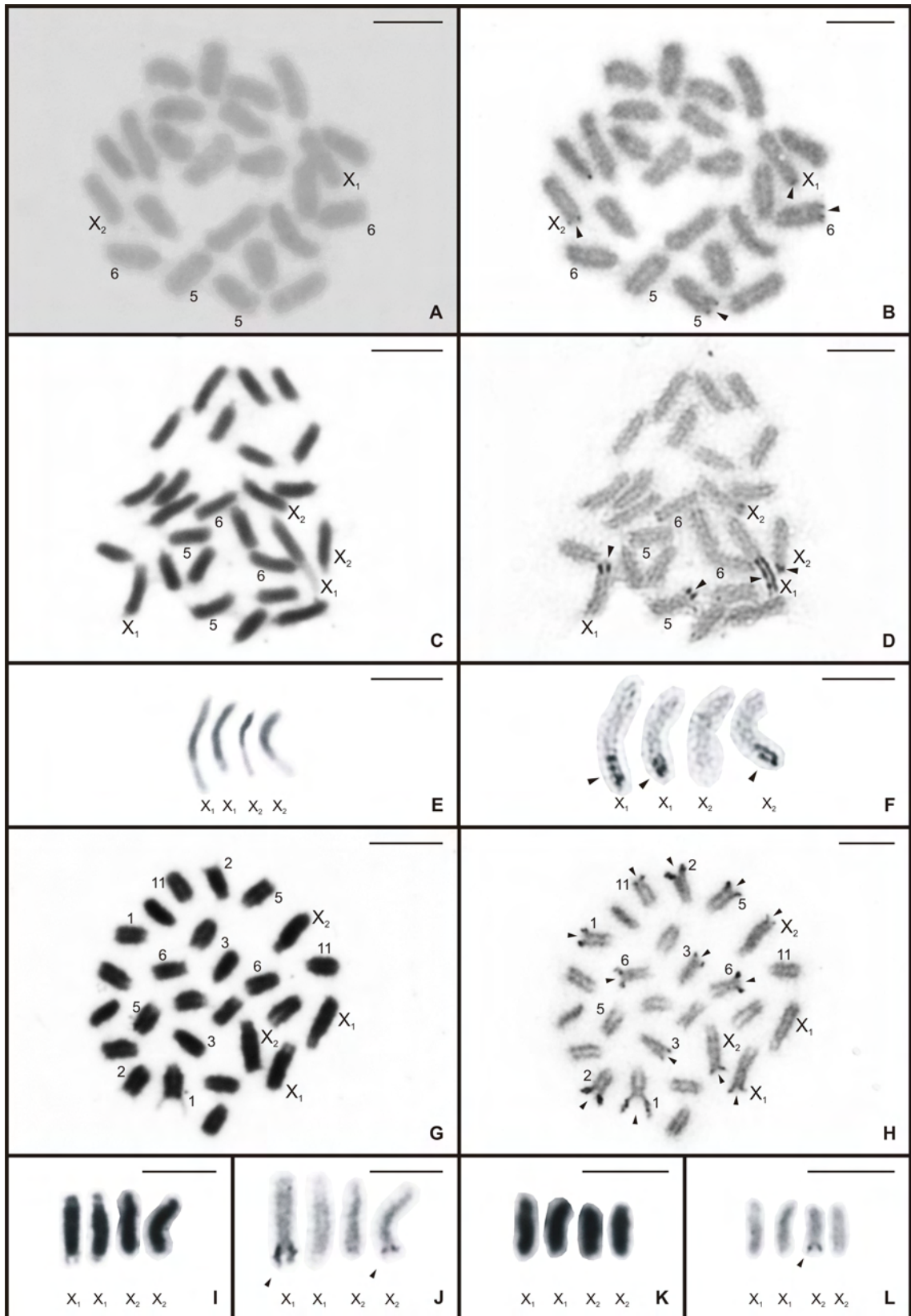


Figura 2 – Cromossomos metafásicos mitóticos de *Nephila clavipes* (A-F) e *Nephila sexpunctata* (G-L) submetidos à coloração sequencial convencional (A, C, E, G, I e K) – impregnação pelo íon prata (B, D, F, H, J e L), mostrando região organizadora de nucléolo (Cabeça de seta=RON) nos pares autossômicos e cromossomos sexuais. Note a diferença de extensão de marcação das RONs entre os cromossomos sexuais de *N. clavipes* (D e F) e de *N. sexpunctata* (H, J e L). A e B. Macho, $2n=22+X_1X_20$. C, D, G, e H. Fêmeas, $2n=22+X_1X_1X_2X_2$. Escala=10 μ m.



6. DISCUSSÃO

Apesar da grande diversidade de número diplóide, morfologia cromossômica e tipo de SCS em Araneae, a maioria dos pesquisadores tem sugerido que a evolução cromossômica nas aranhas envolveu principalmente redução no número cromossômico, levando-se em conta que espécies da subordem Mesothelae, a qual filogeneticamente constitui a linhagem basal de Araneae, mostraram alto número de cromossomos predominantemente telo-acrocêntricos e SCS do tipo X0 ou X₁X₂0 nos machos e que aranhas filogeneticamente derivadas, principalmente aquelas de Entelegynae, exibiram baixo número de cromossomos também telo-acrocêntricos e SCS do tipo X₁X₂0. Essa redução no número diplóide de cromossomos, na maioria das espécies de Entelegynae, parece ter ocorrido através de rearranjos cromossômicos do tipo fusões em tandem e/ou fusões cêntricas seguidas por inversões pericêntricas entre pares autossômicos (Suzuki, 1954; Král et al., 2006, 2010; Araujo, 2007; Král, 2007).

As espécies de *Nephila* analisadas no presente trabalho mostraram características cariotípicas básicas, como número diplóide, morfologia cromossômica, e tipo de SCS, semelhantes aquelas descritas para outros representantes de Nephilidae, *Nephila clavata* L. Koch, 1878 (Suzuki, 1950a, 1950b; Datta & Chatterjee, 1988) e *Nephilengys cruentata* (Araujo et al., 2005a), e para a maioria das espécies filogeneticamente relacionadas pertencentes a Araneoidea, que inclui as famílias Tetragnathidae, Linyphiidae, Nesticidae, e Araneidae (Fig. 3). Estas características diferem acentuadamente daquelas observadas em representantes de Uloboridae, a qual é considerada filogeneticamente um grupo irmão de Araneoidea, de acordo com dados morfológicos e comportamentais (Kuntner et al., 2008). Apesar de existirem poucas espécies de Uloboridae e Araneoidea citogeneticamente analisadas, as informações cariotípicas indicam que os mecanismos de evolução cromossômica diferem entre estes dois grupos, isto é, em Uloboridae ocorreu redução no número de cromossomos, envolvendo principalmente autossomos, e em Araneoidea, o 2n=24 (X₁X₂0) foi conservado na

maioria das espécies ou alterado por aumento no número de cromossomos autossômicos ou cromossomos sexuais; o aumento no número de cromossomos sexuais originou SCS do tipo $X_1X_2X_30$ (Fig. 3).

Nas aranhas Entelegynae, incluindo as duas espécies analisadas neste trabalho, existe simetria marcante em relação ao tamanho dos cromossomos; nas poucas espécies nas quais os cromossomos sexuais X_1 e X_2 foram identificados, estes correspondiam ou estavam entre os maiores elementos do complemento (Rodríguez-Gil et al., 2007; Chemisquy et al., 2008; Stavale et al., 2010; presente trabalho). Esta característica reforça a hipótese de que o SCS do tipo X_1X_20 é basal para as espécies de Entelegynae.

De acordo com revisão realizada por Araujo et al. (2005a), dados sobre a ocorrência de constrições secundárias ou regiões heteropicnóticas negativas nos cromossomos de Araneae são raros e foram descritos apenas para seis espécies. No entanto, para os representantes de Nephilidae, a presença destas regiões não parece ser esporádica, considerando que estas foram observadas em *Nephilengys cruentata* (Araujo et al., 2005a), *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata*. O heteromorfismo de ocorrência e de extensão das constrições secundárias detectado nas espécies de *Nephila* aqui investigadas pode ser explicado pela coincidência destas regiões com as RONS, as quais podem exibir condensação tardia devido a alta atividade de expressão gênica durante a interfase e prófase inicial.

O emprego de técnicas de coloração de regiões cromossômicas específicas tem sido útil para diferenciar espécies relacionadas com cariótipos semelhantes (Schneider et al., 2006). Nas aranhas Entelegynae, o único registro sobre o uso de técnicas de coloração diferencial em cromossomos de representantes do mesmo gênero é aquele de Rodríguez-Gil et al. (2007). Neste trabalho, os autores descreveram diferenças quanto ao tamanho da banda C pericentromérica no cromossomo X_2 de duas espécies de *Polybetes* (Sparassidae).

O padrão de bandas C pericentromérica obtido nos cromossomos de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* é semelhante aquele descrito para a maioria das espécies de Entelegynae cujos cariótipos foram examinados sob este aspecto (Brum-Zorrilla & Cazenave, 1974; Brum-Zorrilla & Postiglioni, 1980; Rowell, 1985; Datta & Chatterjee, 1988; Gorlova et al., 1997; Rodríguez-Gil et al., 2007). No entanto, este padrão difere daquele encontrado por Araujo et al. (2005a) em *Nephilengys cruentata*, na qual as bandas C foram ausentes na região

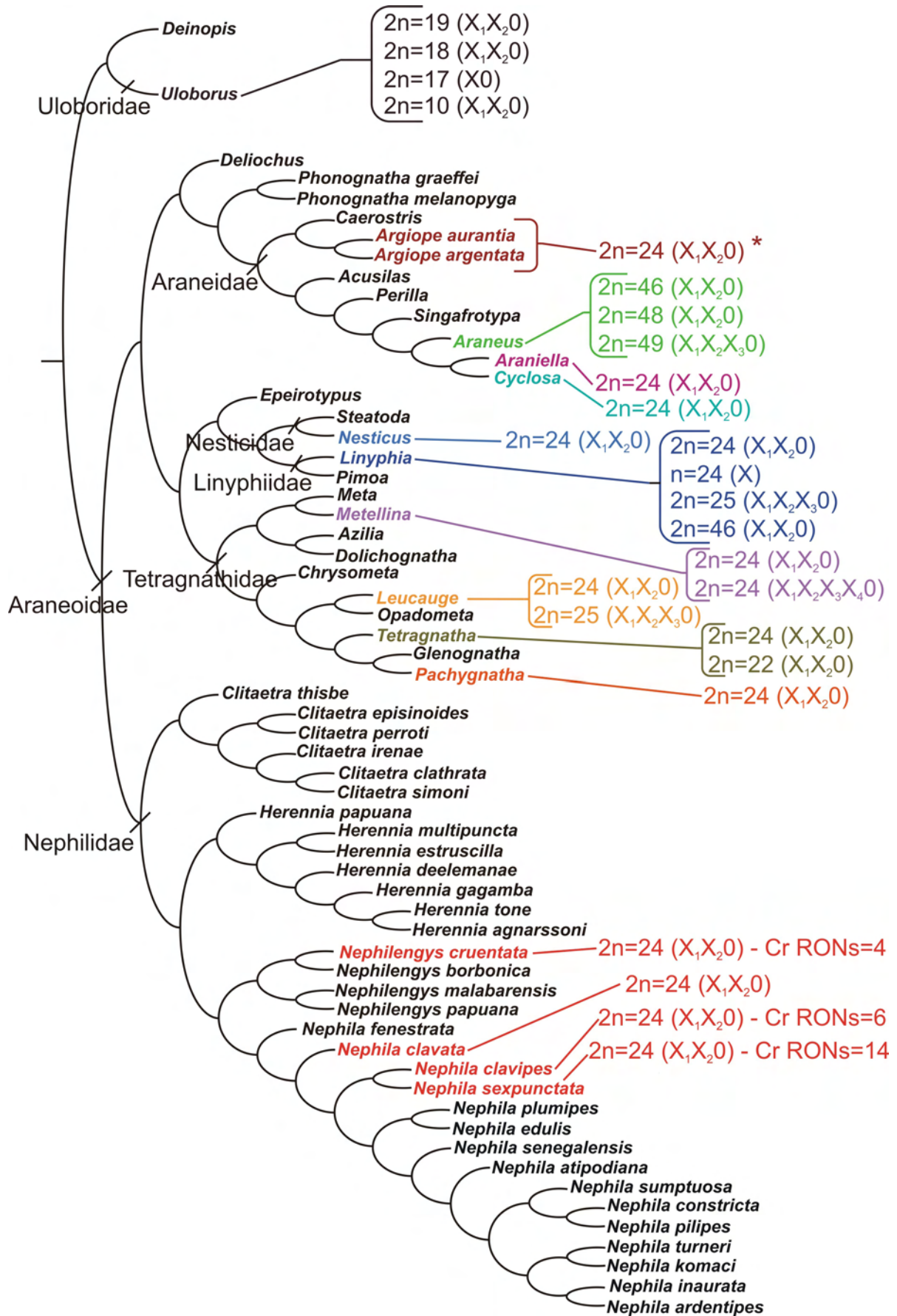
pericentromérica da maioria dos cromossomos e ocorreram predominantemente nas regiões intersticiais e/ou teloméricas de alguns cromossomos.

Entre todas as espécies de Nephilidae, *Nephila sexpunctata* foi aquela que mostrou uma quantidade maior de heterocromatina constitutiva devido a presença de blocos pericentroméricos que se estendem para a região paracentromérica do braço longo dos cromossomos sexuais X_1 e X_2 e bandas C teloméricas em quase todos os cromossomos do complemento. Estas diferenças na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva podem ser explicadas por eventos de duplicação ou deleção.

A descrição de RONS ativas em aranhas Entelegynae restringe-se a oito espécies das famílias Lycosidae, Nephilidae, Oxyopidae, Theridiidae e Sparassidae (Wise, 1983; Barrion et al., 1989; Araujo et al., 2005a; Rodriguez-Gil et al., 2007; Stavale et al., 2010), nas quais o número de cromossomos portadores de RONS variou de 2 a 6; no entanto, nestas espécies, as RONS foram sempre detectadas nos autossomos. O primeiro registro sobre o maior número de cromossomos portadores de RONS e a presença destas regiões nos cromossomos sexuais X_1 e X_2 de Entelegynae está sendo feito para as espécies analisadas neste trabalho, considerando que *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* exibiram, respectivamente, 6 e 14 cromossomos portadores de RONS em indivíduos machos. Em *Nephilengys cruentata*, 4 cromossomos portadores de RONS foram revelados em representantes machos (Araujo et al., 2005a). Nesta última espécie, embora os cromossomos sexuais X_1 e X_2 não tenham sido identificados, estes devem corresponder respectivamente aos pares 1 e 2 carregadores de RONS.

Nas espécies de *Nephila* investigadas nesse trabalho, parece existir uma relação inversa entre a extensão da RON e o número de cromossomos portadores destas regiões. Este fato sugere que translocações parciais das RONS podem ter ocorrido durante a diferenciação cariotípica de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata*. A associação das RONS com regiões heterocromáticas constitutivas corrobora a hipótese de que translocações foram os rearranjos cromossômicos responsáveis pela alteração no número de cromossomos portadores de RONS nestas espécies.

Figura 3 – Relação filogenética e informações citogenéticas referentes a exemplares machos (Araújo, 2007) de alguns gêneros e espécies de Uloboridae, Araneidae, Nesticidae, Linyphiidae, Tetragnathidae, e Nephilidae. *=referente ao gênero *Argiope*. Cr RONS=cromossomos carregadores de regiões organizadoras de nucléolo em representantes machos. (Modificada a partir daquela descrita por Kuntner et al., 2008).



7. CONCLUSÕES

As espécies de *Nephila* citogeneticamente analisadas neste trabalho, quando comparadas com aquelas relacionadas pertencentes a Nephilidae, mostraram uniformidade cariotípica concernente ao número diplóide, morfologia cromossômica, e tipo de sistema cromossômico sexual, e diferenças cariológicas referentes ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva e das RONS. Os mecanismos envolvidos na evolução cromossômica e na diferenciação cariotípica de *Nephila clavipes* e *Nephila sexpunctata* parecem ter sido alterações na quantidade de heterocromatina constitutiva através de rearranjos cromossômicos do tipo pequenas duplicações e/ou deleções, e no número de cromossomos portadores de RONS através de translocações parciais destas regiões associados a segmentos heterocromáticos constitutivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo D., Cella D.M., Brescovit A.D. 2005a: Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, C-Band and base-specific fluorochromes. *Brazilian Journal of Biology*. **65**(2): 193–202.
- Araujo D., Cella D.M., Rheims C.A., Brescovit A.D. 2005b: Chromosomal data of two pholcids (Araneomorphae, Haplogynae): a new diploid number and the first cytogenetical record in the New World clade. *Journal of Arachnology*. **33**(2): 591-596.
- Araujo D. 2007: Citogenética de 13 espécies de aranhas haploginas pertencente às famílias Pholcidae, Sicariidae e Scytodidae (Araneomorphae): evolução cromossômica, sistema cromossômico de determinação sexual e citotaxonomia. Doctoral Thesis, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP.
- 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., Maia U.M., Brescovit A.D. 2010: The first cytogenetic characterization of the poisonous black widow spider *Latrodectus* gr. *curacaviensis* from Brazil, with chromosomal review of the family Theridiidae (Arachnida, Araneae). *Micron*. **41**(2): 165-168.
- Barrion A.A., Amalin D.M., Casal C.V. 1989: Morphology and cytology of the lynx spider *Oxyopes javanus* (Thorell). *Philippine Journal of Science*. **118**(3): 229-237.
- Brescovit A.D. 1999: Araneae. In: Joly C.A., Bicudo C.E.M. (eds): *Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XX*. São Paulo: FAPESP. **5**: 45-56.
- Brum-Zorrilla N. & Cazenave A.M. 1974: Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Experientia*. **30**(1): 94-95.
- Brum-Zorrilla N. & Postiglioni A. 1980: Karyological studies on Uruguayan spiders I. Banding pattern in chromosomes of *Lycosa* species (Araneae-Lycosidae). *Genetica*. **54**(2): 149-153.

Chemisquy M.A., Rodríguez-Gil, S.G., Scioscia C.L., Mola L.M. 2008: Cytogenetic studies of three Lycosidae species from Argentina (Arachnida, Araneae). *Genetics and Molecular Biology*. **31**(4): 857-867.

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

Datta S.N. & Chatterjee K. 1988: Chromosomes and sex determination in 13 araneid spiders of North-Eastern India. *Genetica*. **76**(2): 91-99.

Gorlova O.Y.U., Gorlov I.P., Nevo E., Logunov D.V. 1997: Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. *Bulletin of the British Arachnological Society*. **10**(7): 249-252.

Howell W.M. & Black D.A. 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*. **36**(8): 1014-1015.

Král J. 2007: Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. *Chromosome Research*. **15**(7): 863-879.

Král J., Musilová J., St'áhlavský F., Rezac 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**(8): 859-880.

Král, J., Duliková L., Korinková T., Musilová J., Vitková M., Hedin M., Henriques S.S., Haddad C.R. 2010: Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in Mesothelid and Mygalomorph spiders. In: *18th International Congress of Arachnology*, Siedlce, Poland. Book of Abstracts: 227-229.

Kuntner M., Coddington J.A., Hormiga G. 2008: Phylogeny of extant nephilid orb-weaving spiders (Araneae, Nephilidae): testing morphological and ethological homologies. *Cladistics*. **24**(2): 147-217.

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

Oliveira E.G., Cella D.M., Brescovit A.D., Bertin C.R. 1996: The karyotype of *Loxosceles gaucho* and *Ctenus ornatus* (Arachnida, Araneae, Loxoscelidae, Ctenidae). *Brazilian Journal of Genetics*. **19**(3): 128-128.

Oliveira, E.G., Cella, D.M., Brescovit A.D. 1997: Análises cariotípicas em algumas aranhas das famílias Ctenidae, Lycosidae e Sicariidae. In: *III Encontro de Aracnologia*, Jundiaí. Papo de Aranha. 3-3.

Oliveira R.M., de 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). *Journal of Arachnology*. **35**(2): 293-306.

Platnick N.I. 2010: The world spider catalog, version 11.0. American Museum of Natural History. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Acesso em: 17 set. 2010.

Platnick N.I., Coddington J.A., Forster R.R., Griswold C.E. 1991: Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). *American Museum Novitates*. **3016**: 1-73.

Ramalho M.O., Araujo D., Schneider M.C., Brescovit A.D., Cella D.M. 2008: *Mesabolivar brasiliensis* (Moenkhaus 1898) and *Mesabolivar cyaneotaeniatus* (Keyserling 1891) (Araneomorphae, Pholcidae): close relationship reinforced by cytogenetic analyses. *Journal of Arachnology*. **36**(2): 453-456.

Rodríguez-Gil S.G, Merani M.S., Scioscia C.L., Mola L.M. 2007: Cytogenetics in three species of *Polybetes* Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae). I. Karyotype and chromosome banding pattern. *Journal of Arachnology*. **35**(2): 227-237.

Rowell D.M. 1985: Complex sex-linked fusion heterozygosity in the Australian huntsman spider *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). *Chromosoma*. **93**(2): 169-176.

Rowell D.M. 1991: Chromosomal fusion and meiotic behaviour in *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). II. Chiasma position and its implications for speciation. *Genome*. **34**(4): 567-573.

Schneider M.C., Almeida M.C. de, Rosa S.P., Costa C., Cella D.M. 2006: Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA3/DA/DAPI staining. *Genetica (The Hague)*. **128**: 333-346.

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

Stavale L.M., Schneider M.C., Araújo D., Brescovit A.D., Cella D.M. 2010: Chromosomes of Theridiidae spiders (Entelegynae): Interspecific karyotype diversity in *Argyrodes* and diploid number intraspecific variability in *Nesticodes rufipes*. *Genetics and Molecular Biology*. doi: 10.1590/S1415-47572010005000076.

Sumner A.T. 1972: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. **75**(1): 304-306.

Suzuki S. 1950a: Sex determination and karyotypes in spiders. *Zoological Magazine*.

59: 31-32.

Suzuki S. 1950b: Spiders with extremely low and high chromosome numbers. *Japanese Journal of Genetics*. **25**: 221-222.

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

Webb G.C., White M.J.D., Contreras N., Cheney J. 1978: Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formerly *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. *Chromosoma*. **67**(4): 309-339.

Wise D. 1983: An electron microscope study of the karyotypes of two wolf spiders. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. **25**: 161-168.

Rio Claro, 17 de dezembro de 2010

Emygdio de Paula Neto
Graduando

Doralice Maria Cella
Orientadora

Marielle Cristina Schneider
Co-orientadora

ANEXO

