
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Zoologia

**ANÁLISE TAXONÔMICA DE ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DO GÊNERO *RHINOCRICUS*
POR MEIO DA MORFOMETRIA,
CITOGENÉTICA E MARCADORES
MOLECULARES**

IZABELA BRAGGIÃO CALLIGARIS



Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia)

Rio Claro/SP
Fevereiro - 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Zoologia

**ANÁLISE TAXONÔMICA DE ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DO GÊNERO *RHINOCRICUS*
POR MEIO DA MORFOMETRIA,
CITOGENÉTICA E MARCADORES
MOLECULARES**

IZABELA BRAGGIÃO CALLIGARIS

ORIENTADORA: CARMEM S FONTANETTI CHRISTOFOLETTI



Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia)

Rio Claro/SP
Fevereiro - 2006

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	3
I-Introdução.....	4
II-Revisão de Literatura.....	9
III- Material e Métodos.....	18
III.1- Material.....	18
III.2- Métodos.....	19
III.2.1- Análise morfométrica.....	19
III.2.2- Preparações cromossômicas.....	20
III.2.3- Análise citogenética.....	21
III.2.4- Documentação dos resultados.....	21
III.2.5- Marcadores moleculares.....	21
IV- Resultados.....	24
Capítulo 1.....	26
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Material and Methods.....	29
Results.....	30
Table I.....	35
Table II.....	36
Table III.....	37
Table IV.....	38
Table V.....	39
Table VI.....	40
Figure 1.....	41
Figure 2.....	42
Figure 3.....	43
Figure 4.....	44
Discussion.....	31

References.....	33
Capítulo 2.....	45
Abstract.....	46
Introduction.....	47
Material and Methods.....	48
Results.....	48
Table 1.....	54
Table 2.....	54
Figure 1;2.....	55
Figure 3;4;5.....	56
Figure 6.....	57
Figure 7.....	58
Dicussion.....	50
References.....	52
Capítulo 3.....	59
Resumo.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	62
Resultados e Discussão.....	65
Tabela I.....	72
Tabela II.....	73
Tabela III.....	73
Tabela IV.....	74
Figura 1.....	75
Figura 2.....	76
Referências.....	69
Capítulo 4.....	77
Resumo.....	78
Introdução.....	79
Material e Métodos.....	80
Resultados.....	81

Figuras 1,2.....	89
Figuras 3,4.....	89
Figuras 5,6 e 7.....	90
Discussão.....	82
Referências.....	84
V- Considerações finais.....	91
VI- Literatura citada.....	96

Dedico esta tese de todo coração às três pessoas mais importantes da minha vida, meu filho, meu marido e minha mãe.

Agradecimentos

Acredito que não poderia ter concluído esta tese sem a presença de Deus para me dar esperança nas horas difíceis e força para vencer os obstáculos. Muito obrigada por permitir a minha existência, aprendendo a valorizá-la e respeitando-a.

A Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, pela confiança em meu trabalho, pela compreensão e pela amizade. Foi muito importante ter um exemplo de profissionalismo e de ser humano.

A Profa. Dra. Lílian Boccardo pelas sugestões oferecidas nos relatórios e nos artigos originados desta tese.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Martins que me auxiliou em todas as etapas da análise molecular, não medindo esforços para que conseguisse obter resultados satisfatórios.

Ao Prof. Dr. José Chaud Netto pelos conselhos, auxílio e paciência para explicar minhas dúvidas de estatística.

À técnica do laboratório de citogenética e minha amiga Rogilene Ap. Prado, pelo incentivo, auxílio e paciência, durante o tempo de convivência que tivemos. Muita sorte nesta nova etapa de sua vida e, principalmente muito sucesso!

Aos amigos do Departamento de Biologia e Citogenética da UNESP, Akio, Thati, Thaís, Juliana, Zé Guto, Marcinha, Márcio, Marielle, Vanessa, Zezão, Pedro, Renata, Dânia, Dú, Reinaldo, Bombeiro, alguns que já se encontram em nova etapa de sua vida, mas foram importantes durante o tempo que estiveram por aqui, agradeço pela convivência, conselhos e auxílio.

À Profa. Dra. Sanae Kasahara pelos conselhos e oportunidade de aprendizado tanto durante a convivência no laboratório quanto durante o estágio docência.

À amiga Ana Paula Zampieri Silva e Fernando Ananias pelo auxílio na busca de melhores resultados durante as análises citogenéticas.

Ao amigo Kleber Agari Campos que me auxiliou no início do Doutorado, dedicando seu tempo para me auxiliar nas coletas e preparo do material no laboratório.

Ao CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) pela oportunidade de utilizar o laboratório para as análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pelo auxílio prestado nas análises dos resultados da análise molecular.

Ao amigo Marcos Rogério Sanches que com muita paciência me explicou e auxiliou nas análises estatísticas utilizadas para interpretação dos resultados de morfometria.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UNESP pela dedicação e convívio durante estes quatro anos.

À Monika Lamonte e Antônio T. Yabuki pelo auxílio prestado no preparo do material para microscopia eletrônica de varredura e manuseio do microscópio eletrônico.

À Silvia Tamie Matsumoto pela amizade durante o tempo em que esteve em Rio Claro, e mesmo distante.

Aos Prof. Drs. Antonio Carlos Simões Pião e Maria Lucia Lorenzetti Wodewotzki pelo auxílio prestado nas análises estatísticas.

Ao Reinaldo pela paciência em prestar auxílio para documentação fotográfica dos resultados de citogenética, algumas vezes retardando seu próprio trabalho. Tudo bem que suas metáfases são maravilhosas....não fico mais com inveja, consegui as minhas! (claro, não tão maravilhosas, mas..)

Ao meu marido Aldo Calligaris Neto pelo apoio, paciência e carinho durante todo este período.

À minha mãe Valentina Braggião que muito me ajudou não só neste período tumultuado, mas que sempre foi exemplo de dedicação e perseverança.

Ao meu filho Lucas Braggião Calligaris que mesmo não tendo noção de todo o meu trabalho, compreendeu os momentos de ausência e sempre me esperava com um grande abraço.

À minha sogra Neusa Baptista e à avó Anita pelo auxílio em cuidar do Luquinhas para que eu ficasse tranqüila e pudesse me dedicar para conclusão desta tese.

À Profa. Dra. Maria Ap. Marim Morales pelas dicas e sugestões na obtenção das metáfases.

À Profa. Dra. Maria Isabel Camargo Mathias que no início deste Doutorado me recebeu para que pudesse estar aqui, neste momento, concluindo mais uma etapa da minha vida pessoal e profissional.

À Lucila que sempre foi muito gentil e prestativa, realizando seu trabalho com muita competência.

Ao amigo Eduardo Murakami pelo auxílio prestado nas ampliações das fotos de citogenética.

Ao CNPQ e FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

Enfim agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram durante estes anos para que pudesse entregar esta tese.

Resumo

RESUMO

Foram estudados organismos pertencentes ao gênero *Rhinocricus*, muito semelhantes em seus caracteres diagnósticos; pela taxonomia clássica, inclui-se neste grupo *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 e *Rhinocricus varians* Brolemann, 1901. Ambas as espécies apresentam, quando juntas, um gradiente de coloração que vai do marrom escuro ao bege claro, independente de sua idade ou tamanho. Para a realização deste trabalho, os organismos foram separados, de acordo com a coloração em escuros, médios e claros. Utilizou-se então de várias ferramentas no intuito de validar ou não estas espécies. A análise morfométrica, utilizando caracteres morfológicos comumente utilizados na descrição taxonômica clássica, demonstrou que os indivíduos de coloração escura estão mais distantes em relação às outras colorações. Este resultado sugere que os indivíduos de coloração escura pertenceriam a uma espécie distinta e os de coloração média e clara à outra, a qual apresentaria um alto polimorfismo quanto ao caráter coloração. Foi utilizado também o número de cones apicais desses indivíduos, que em diplópodos é espécie/específico. Os resultados demonstraram, estatisticamente, que os indivíduos de coloração escura apresentam número médio de cones apicais das antenas maior, quando comparado aos médios e claros. Observa-se também que no grupo analisado este caráter não é espécie/específico. Na análise molecular (RAPD), os resultados indicaram que o caráter coloração não auxilia na distinção das mesmas, pois ocorreram grupamentos de indivíduos de coloração escura com clara. Os dados obtidos sugerem ainda a presença de mais de uma espécie no grupo estudado. Na análise citogenética, o número diplóide para todas as colorações foi o mesmo ($2n=20$); não foi observado também nenhuma diferença no padrão de bandas C e de AgRON na amostra. Podemos sugerir que o grupo analisado é composto por

mais de uma espécie, sendo os indivíduos de coloração clara nominados como *R. padbergi* e os escuros como *R. varians*.

ABSTRACT

In this study we examined species of the genus *Rhinocricus* exhibiting very similar diagnostic traits. According to traditional taxonomy, members of this group include *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 and *Rhinocricus varians* Brolemann, 1901. When compared, both species exhibit a gradient of colors ranging from dark brown to light beige, regardless of age or size. For this study, individuals were separated as dark, intermediate, and light colored. In order to validate or not these species, several tools were employed. Using morphological traits commonly applied in traditional taxonomy, morphometric analysis revealed that dark colored individuals are more distant compared to lighter colored individuals. This suggests that dark colored individuals might belong to a different species, while intermediate and light colored ones present high levels of color polymorphism. We also utilized the number of apical cones, as this is a species-specific trait in diplopods. The results statistically demonstrated that, on average, dark colored individuals present more apical cones of the antennae than intermediate and light colored ones. This trait, however, was not species-specific in the group analyzed. Molecular analysis (RAPD) revealed that color was not useful to distinguish assemblages, as dark and light colored individuals were observed in the same groups. Our data suggest the presence of one additional species in the study group. Cytogenetic analysis revealed that the diploid number of these animals is the same regardless of color ($2n=20$). In addition, we did not observe differences in the pattern of C bands and AgRON in the sample. Our results suggest that the analyzed group consists of more than one species, with light colored individuals named *R. padbergi* and dark colored ones as *R. varians*.

Introdução

I- INTRODUÇÃO

No Filo Arthropoda, mais especificamente entre os Tracheata, encontram-se quatro classes de animais na superclasse Myriapoda. Estas classes são: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda e Symphyla (RUPPERT et al, 2005).

Os Diplopoda são popularmente conhecidos como piolhos-de-cobra, embuás, gongos, gôngolos e milípedes, em alusão ao grande número de pernas que possuem. O tamanho desses organismos pode variar de 2mm a 30cm de comprimento e a coloração varia do negro ao marrom, podendo ser encontrados organismos com tons vermelhos ou alaranjados (RUPPERT et al, 2005).

São animais que habitam locais úmidos e preferencialmente sem luz, permanecendo embaixo de troncos, rochas, folhagens e uns poucos comensais em ninhos de formigas e cupins.

O tegumento, por apresentar sais de cálcio (exceto Pselaphognatha), é bastante resistente, podendo apresentar tubérculos, espinhos e cerdas isoladas (RUPPERT; BARNES, 1996).

O corpo é dividido em cabeça, tronco e telson. O tronco é diplossegmentado, apresentando dois pares de pernas por diplossegmento, exceto o primeiro, segundo, terceiro e quarto e alguns dos últimos que são desprovidos de apêndices. Todas as ordens apresentam em cada segmento ou em alguns deles, uma abertura de glândula (poro repugnatório) que produz uma secreção na qual foram identificados aldeídos, quinonas, fenóis e cianeto de hidrogênio, que é tóxico ou repelente e cáustico para a pele humana. Isso constitui, além do tegumento, a melhor proteção dos diplópodos. Em alguns grupos, entretanto, essas glândulas são ausentes (HOPKIN; READ, 1992).

A alimentação consiste de detritos em geral, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos além de relativa quantidade de matéria orgânica do solo (SCHUBART, 1942). Esse grupo torna-se então, importante para a dinâmica do solo provocando maior aeração e enriquecimento da matéria orgânica nele presente.

A produção de detritos pelos diplópodos, ou “mull” como dizem os norte-americanos, é a característica ecológica de maior importância do grupo. Romell (1935) a partir de experimentos e análises concluiu que os diplópodos interrompem a decomposição iniciada pelos fungos e proporcionam a mistura da parte mineral do solo com o húmus. Fato semelhante foi verificado por Fontanetti (1989) em espécies brasileiras de Chelodesmidae.

São raros os relatos de diplópodos considerados pragas na agricultura; Schubart (1942) cita que embora os miriápodos não possam ser considerados como pragas, a classe Diplopoda é a mais importante nesse sentido. Na Austrália, o julida *Ommatoiulus moreletii* é uma praga em algumas áreas, provocando transtornos, entrando em grande número dentro das casas (BAKER, 1985; McKILLUP; BAILEY, 1990). Em Patrocínio, Minas Gerais, observa-se também uma enorme expansão populacional da espécie *Plusioporus setiger* (Spirostreptidae), provavelmente devido à introdução de adubação orgânica e irrigação das lavouras de café; os animais invadem as casazs, danificam hortas,

pomares e pequenas plantações e pela quantidade, depois de mortos exalam forte mau cheiro (BOCCARDO et al., 1997; 2002).

Apesar desses relatos, esses organismos causam mais benefícios que danos; em Porto Rico, *Rhinocricus arboreus* atacou a cochonilha *Lepidosaphes beckii*, uma praga da laranja, sendo utilizado com sucesso no controle biológico (SCHUBART, 1942).

Os Diplopoda compreendem provavelmente cerca de 80.000 espécies mas somente entre 11 a 12% foram descritas. Ocorrem em todos os ambientes exceto na Antártica, com a fauna tropical pouco conhecida. No mundo cerca de 11.000 espécies/subespécies de diplópodos são descritas até agora, alocadas em 4.500 gêneros, aproximadamente 170 famílias e 15 ordens. O conhecimento da fauna neotropical (América do Sul e Central e oeste da Índia) compreende somente cerca de 1.100 a 1.200 espécies/subespécies em mais de 800 gêneros, 47 famílias e 13 ordens (HOFFMAN et al, 2002).

A classe Diplopoda, segundo Hoffman (1979), é subdividida em três subclasses: Pselaphognatha, Pentazonia e Helminthomorpha. Na primeira, os machos não possuem aparatos especializados para cópula (gonopódios). Já os Pentazonia apresentam estas estruturas localizadas na região posterior do corpo. Na última subclasse citada, os machos apresentam um ou ambos os pares de pernas do sétimo segmento, modificados em gonopódios. A subclasse Helminthomorpha engloba sete superordens e uma posição superordinal incerta, reunindo um total de 11 ordens com numerosas famílias, tribos, gêneros e espécies, e pensa-se que muito dessa fauna ainda está por ser descrita.

A taxonomia do grupo é confusa em certas famílias e gêneros, principalmente naqueles em que se observam caracteres morfológicos muito semelhantes. Neste contexto podemos citar o gênero *Rhinocricus*, descrito por Karsch, 1881.

Duas espécies deste gênero, *Rhinocricus varians* Broelemann, 1901 e *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 apresentam grande similaridade na maioria de seus caracteres morfológicos e são freqüentemente encontradas no mesmo

habitat. Essa semelhança dificulta a identificação dessas espécies, uma vez que seus gonopódios são praticamente idênticos. Uma das características utilizadas para diferenciar estas duas espécies é a coloração, sendo *R. varians* mais escura que *R. padbergi* (SCHUBART, 1951). Entretanto, quando vários indivíduos de ambas as espécies, são comparados, independentemente de sua idade ou tamanho, observa-se um gradiente de coloração que vai do bruno-denegrado escuro ao bege claro, havendo sobreposição entre o padrão de coloração de ambas as espécies.

Os caracteres morfológicos normalmente utilizados nos sistemas de classificação, muitas vezes mostram-se insuficientes para a diferenciação entre espécies ou grupos muito próximos. A genitália é considerada o complexo de caracteres mais seguro para a taxonomia, por ser espécie-específica para a grande maioria dos grupos animais, mas em alguns grupos este caráter é muito semelhante, não sendo recomendável sua utilização na identificação das espécies. A ação do meio ambiente sobre os caracteres anatômicos pode levar a identificações incorretas, sendo necessário aliar esse sistema a outros dados tais como os resultantes de análises citogenéticas, uso de marcadores moleculares, etc (GREILHUBER, 1984).

As antenas dos diplópodos são extremamente importantes por apresentarem função sensorial e transmitir aos animais informações sobre o ambiente. Os diplópodos apresentam um par de antenas, formadas por oito artículos. O artículo apical é usualmente pequeno e contém sensilas características do tipo cone; outros artículos são cobertos com uma variedade de estruturas sensoriais, incluindo mecanorreceptores e quimiorreceptores de contato com funções olfatórias e gustativas (HOPKIN; READ, 1992).

Sabe-se atualmente, que os estudos citogenéticos têm-se revelado importantes na elaboração de uma sistemática eficiente em muitos grupos animais, principalmente naqueles compostos por espécies cujo padrão morfológico não é suficiente no seu reconhecimento. Isto aplica-se também a diplópodos. Nesse sentido, Fontanetti (1996a) utilizou o número de cromossomos

para validar uma espécie de *Pseudonannolene*, *P. silvestris* ($2n=16$), cuja validade foi colocada em dúvida, devido sua semelhança com *P. tricolor* ($2n=14$).

A técnica RAPD (random amplified polymorphic DNA), utilizada na sistemática de vários grupos, significa DNA polimórfico amplificado ao acaso e foi descrita por Williams et al. (1991). Essa técnica consiste na amplificação por PCR de segmentos de DNA, com a utilização de um único “primer” com apenas 10 pares de bases, gerando fragmentos de DNA que são amplificados para alguns indivíduos, mas não para outros aparentados e que são herdados de maneira similar a caracteres mendelianos. Essa técnica tem sido usada por diversos autores para caracterizar gêneros e espécies em muitos grupos de organismos.

O objetivo desta tese foi correlacionar a razão da variação do gradiente de coloração observado em indivíduos pertencentes ao gênero *Rhinocricus*, extremamente semelhantes em seus caracteres morfológicos, que dificulta a identificação destes. As hipóteses para a elaboração desta tese foram: se no grupo estudado estariam presentes as duas espécies citadas na literatura, *R. varians* de coloração mais escura e *R. padbergi* de coloração mais clara; se isso ocorresse, qual seria polimórfica quanto ao caracter coloração. A segunda hipótese era a presença de uma única espécie que apresentaria este alto polimorfismo quanto à coloração de seus representantes. Nesse sentido foram utilizadas as ferramentas:

- análise estatística das diferenças morfológicas e dos cones apicais antenais;
- utilização de marcadores moleculares por meio da técnica de RAPD;
- análise citogenética utilizando técnicas de coloração convencional e coloração diferencial.

Revisão de Literatura

II- REVISÃO DE LITERATURA

A família Rhinocricidae ocupa principalmente as regiões tropicais, sendo largamente distribuída na América do Sul, América Central e parte sul da América do Norte.

Muitas de suas espécies são caracterizadas pela bela coloração que varia de preto brilhante até castanho-claro, podendo ocorrer faixas transversais brancas, amarelas ou de vermelho-sanguíneo, produzido pela cor da margem distal dos metazonitos (SCHUBART, 1951).

Ocorre uma grande variação de tamanho em algumas espécies. Carl (1912 apud SCHUBART, 1951) cita *Dinematocricus challengerii* Pocock, em que o macho atinge 50mm e a fêmea 90mm. Em *Rhinocricus cachoeirensis*, o menor macho analisado apresenta 52mm e 52 (-1) segmentos e o maior 112mm e 51 (-1) segmentos; pode-se observar então, que o tamanho não está relacionado com o número de segmentos, que pode variar de 37-79 (SCHUBART, 1951).

Todas as espécies alimentam-se de detritos, misturados quase sempre com tecido vegetal, pedaços de folhas e vasos lenhosos. Por habitar as camadas mais profundas do húmus, devido ao exoesqueleto calcificado e glândulas repugnatórias, possuem poucos inimigos naturais, sendo de maneira geral impalatáveis. Schubart (1951) cita restos de tegumentos de *Rhinocricus padbergi*

em Opiliones e comenta não haver nenhuma indicação de aves predadoras de diplópodos.

Os Rhinocricidae são encontrados em lugares baixos e quentes, até 1.500 a 2.000m de altitude, sendo menor sua ocorrência em altitudes superiores a 2.000m. No continente Americano, atingem o sul dos Estados Unidos; do lado oposto atingem a Argentina e Chile (SCHUBART, 1951).

Brölemann (1901) num estudo dos miriápodos do Museu de São Paulo considerou *Rhinocricus* um gênero pertencente à família Spirobolidae; dentro desse gênero, o autor foi o responsável pela descrição de sete das oito espécies citadas no artigo.

Em 1909, Brölemann organizou um catálogo dos miriápodos do Brasil. Nesse trabalho *Rhinocricus* ainda consta como um gênero da família Spirobolidae, mas compreendendo agora dezessete espécies.

Os *Rhinocricus* passam a ser incluídos na família Rhinocricidae da ordem Spirobolida por Brölemann em 1913, na primeira classificação moderna dos Spirobolida (HOFFMAN, 1979).

Schubart em 1962a, enumerou dez novas espécies pertencentes à família Rhinocricidae no Brasil. Neste trabalho, considerou três subgêneros *Erythrocriscus*, *Rhinocricus* e *Argentocriscus*. Em outro trabalho, Schubart (1962b) descreveu um novo gênero monotípico da família Rhinocricidae na Bahia: *Poecilocriscus*, que apresenta uma única espécie, *P. singularis*. Segundo o autor, este novo gênero se deve a formação baixa do esternito nitidamente separado de todos os outros gêneros. No Brasil estão presentes somente os gêneros *Rhinocricus* e *Eurhinocricus*.

Rhinocricus varians foi considerada por Brölemann (1901) como uma variação de *Rhinocricus nattereri* (HUMBERT; SAUSSURE, 1870 apud SCHUBART, 1951). Em 1951, Schubart considerou *R. varians* como uma espécie, caracterizando-a pela coloração bruno-denegrado, com tonalidade de violáceo e os metazonitos mais claros, antenas pardas, com os últimos artículos mais claros, amarelados e pernas castanho-amareladas, apresentando comprimento médio de

73,5mm e telson com processo pré-anal grande, bem saliente. Esta última característica foi marcante para separar *R. varians* de *R. nattereri*, que não possui um processo pré-anal saliente.

Rhinocricus padbergi Verhoeff, 1938 foi também descrita inicialmente como pertencente à *R. nattereri* (*Rhinocricus nattereri padbergi* Verhoeff, 1938) mas Schubart a elevou ao nível de espécie em 1944 (SCHUBART, 1944). Para este autor, esta espécie é facilmente reconhecida quando viva pela cor castanho-rosa até acajú, tendo o telson denegrado e as antenas e pernas flavo-esbranquiçadas, apresentando um comprimento médio de 64,1mm (SCHUBART, 1951).

O tamanho dos diplópodos pode variar de acordo com a idade, sexo, disponibilidade de alimento, habitat, latitude, altitude e pela coexistência com outros organismos. Em grupos como Julida e alguns outros Colobognatha, em que o crescimento inclui aquisição de novos segmentos, e que freqüentemente continua após atingir o estágio adulto, o tamanho, como caráter taxonômico, deve ser utilizado com cautela (ENGHOFF, 1992). Em alguns Rhinocricidae, a aquisição de novos segmentos pára no estágio adulto, apesar de alguns sofrerem muda para aumento de tamanho; por esse fato, o número de segmentos e não o diâmetro pode ser utilizado como caráter taxonômico (ENGHOFF, 1992).

A genitália é considerada o complexo de caracteres mais seguro para a taxonomia a nível de espécie em muitos grupos de animais, mas pode-se encontrar grupos em que este caráter é muito semelhante, não sendo aconselhável sua utilização para identificação taxonômica (HOFFMAN et al, 2002).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos utilizando a análise morfométrica associada a análises estatísticas multivariadas para identificação de taxa, dimorfismo entre indivíduos etc (CHAUD-NETTO, 1973; FORTUNER; MAGGENTI, 1991; MAPATUNA-YASANTHA, et al., 2002; PERUQUETTI, 2002).

Os diplópodos constantemente tocam o substrato com suas antenas enquanto se movimentam. Esses órgãos são importantes para prover o animal com informações sobre o meio ambiente, como orientação, localização de

alimento e para reprodução (CAREY; BULL, 1986; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1951).

A estrutura e função das diferentes sensilas antenais nos diplópodos foram bem descritas por Nguyen Duy-Jacquemin (1990) estudando espécies européias.

São encontrados cinco tipos de estruturas sensoriais nas antenas dos Lulidae: cones apicais, única estrutura presente no oitavo artigo, sensila basicônica espiniforme, sensila quética, sensila tricóidea e sensila basicônica (HOPKIN; READ, 1992; NGUYEN DUY-JACQUEMIM, 1985a; 1990; NGUYEN DUY-JACQUEMIM; ARNOLD, 1991). São classificadas segundo diversas características como a presença ou ausência de poros, localização dos poros e presença ou ausência de uma base articulada (NGUYEN DUY-JACQUEMIN, 1990).

A função dos cones apicais é mecanossensitiva e também gustativa e olfatória, e são caracterizados pela presença de uma base articulada (NGUYEN DUY-JACQUEMIN, 1985; HOPKIN; READ, 1996).

O número de cones apicais geralmente encontrado no oitavo artigo da antena dos diplópodos é quatro, dispostos na forma de um quadrado, sendo dois cones dorsais e dois ventrais (NGUYEN DUY-JACQUEMIN, 1985; 1996; 1997; NGUYEN DUY-JACQUEMIN; ARNOLD, 1991).

As antenas dos *Rhinocricus* são relativamente pequenas, sendo somente os artigos distais cobertos de cerdas; o último possui quatro ou numerosos cones sensitivos, número que pode variar de 10 a 100 ou mais, porém é constante para cada espécie (SCHUBART, 1951).

R. padbergi apresenta sensilas tipo tricóidea, basicônica e quética que aparecem do IV ao VII artigo. Em estudo recente, foi encontrada variação no número dos cones apicais, única estrutura presente no oitavo artigo, sendo que num total de 10 espécimens analisados, o número de cones variou de 13 a 18 (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004).

Os dados citológicos mais utilizados para a caracterização de uma espécie são: número cromossômico, morfologia cromossômica e padrões de bandamento

de cromossomos metafásicos mitóticos. O estudo dos cromossomos meióticos também constitui um dado de grande importância nas análises citogenéticas, pois revela características e comportamentos cromossômicos somente visualizados durante este tipo de divisão celular.

A citogenética, não só de Diplopoda, mas dos miriápodos de modo geral, é pouco explorada e conseqüentemente, pouco conhecida. Os principais pesquisadores a se interessarem por estudos citogenéticos de diplópodos foram Achar e Chowdaiah, estudando espécies asiáticas (ACHAR, 1983a, b; 1984 a,b, 1985; 1986; 1987; ACHAR; CHOWDAIAH, 1979, 1980; CHOWDAIAH, 1966a, b, c; 1967; 1969; CHOWDAIAH; KANAKA, 1969; 1974; 1979).

White (1979) fez referência sobre a necessidade de conhecer que tipos de polimorfismos citogenéticos ocorreram na evolução de cariótipos de diplópodos e como os cromossomos se comportam na meiose de indivíduos de ambientes naturais e híbridos de laboratório.

Em espécies brasileiras, Fontanetti e colaboradores catalogaram o número cromossômico e o sistema de determinação do sexo em diplópodos, totalizando até o momento 16 espécies estudadas, número bastante reduzido se comparado com o número estimado de 2000 a 3000 espécies para o Brasil (FONTANETTI, 1991; 1996a, b; c; 1998; 2000; FONTANETTI et al., 2002; CAMPOS; FONTANETTI, 2004; 2005; SOUZA et al., 2005).

Fontanetti (1990) sugeriu a seqüência da prófase I para a maioria das espécies de Diplopoda. Segundo a autora, esta fase é caracterizada por apresentar um estágio difuso bastante longo, acelerando o processo meiótico a partir do diplóteno. As raras metáfases apresentam cromossomos bastante unidos ou mesmo agregados num único bloco. Este fato foi observado em várias espécies de diferentes regiões e táxons (CHOWDAIAH; KANAKA, 1969; 1974).

A quantidade de informações sobre a composição e a distribuição do DNA ao longo do cromossomo tem aumentado com o surgimento de novas técnicas de coloração. As técnicas de bandamento cromossômico, tais como bandamento C, bandamento NOR ou por fluorocromos base específicos, têm sido utilizadas em

estudos citogenéticos, por possibilitarem uma análise mais detalhada da organização da estrutura cromossômica. Os estudos envolvendo bandamentos baseiam-se na coloração diferencial da heterocromatina constitutiva por fluorocromos ou por Giemsa (BERNINI, 1997).

O número diplóide em diplópodos varia de $2n=8$ até $2n=30$, porém, há dúvidas quanto ao primeiro número citado ($2n=8$), em virtude das dificuldades técnicas da época em que foi detectado por Bessièrre (1948). O mecanismo de determinação sexual comumente encontrado é de XY para machos e XX para fêmeas.

Achar (1983a) estudando *Spirostreptus asthenes*, comenta que o mecanismo de determinação do sexo nos Diplopoda se encontra num estado primitivo, pois na maioria das espécies os cromossomos sexuais são pouco diferenciados dos autossomos.

Os Diplopoda são mais conservadores em seus cromossomos sexuais que os Chilopoda e talvez, também mais conservadores com respeito à evolução cariotípica em geral (WHITE, 1979).

O emprego de técnicas citogenéticas diferenciais em cromossomos de diplópodos é raro, principalmente devido às dificuldades técnicas na obtenção de cromossomos mitóticos, sendo a maioria das informações baseadas em análises feitas com coloração convencional. Alguns trabalhos foram realizados em espécies de outras regiões (ACHAR; CHOWDAIAH, 1980; ACHAR, 1983a; VITTURI et al., 1997; 2001)

Em espécies brasileiras, recentemente conseguiu-se adequar uma técnica que proporcionou um número razoável de cromossomos mitóticos. Esses núcleos foram obtidos a partir de células do intestino médio de indivíduos submetidos a longo período de jejum. Dessa forma pôde-se realizar um estudo mais aprofundado, com o emprego de técnicas citogenéticas mais modernas em diferentes espécies do gênero *Pseudonannolene* (PRADO; FONTANETTI, 2000; CAMPOS; FONTANETTI, 2004; 2005; SOUZA et al., 2005).

Apesar de raro, alguns outros trabalhos realizados em espécies de outras regiões, também têm sido reportados (ACHAR; CHOWDAIAH, 1980; ACHAR, 1983a; VITTURI et al., 1997; 2001).

Mesmo que os rearranjos cromossômicos nem sempre influenciem o número e a morfologia dos cromossomos, é possível encontrar diferenças na constituição desses, tal como na localização ou extensão de blocos de heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolo.

O advento de técnicas citogenéticas diferenciais, como impregnação pelo íon prata, bandamentos C, Q e N e a utilização de fluorocromos AT e GC específicos, possibilitou estudos comparativos entre as populações e espécies em diversos grupos animais e vegetais, evidenciando, às vezes, rearranjos cromossômicos importantes, não detectáveis por colorações citogenéticas convencionais. Desta maneira, essas técnicas não só ajudam no entendimento da estrutura cromossômica, como também podem possuir valor taxonômico.

A eletroforese ainda é uma das ferramentas mais usadas para revelação de variações genéticas, dentre as técnicas de medida direta dos produtos do DNA dos organismos, pois as proteínas constituem-se em marcadores imediatos dos genes estruturais. Assim, mudanças de ocorrências naturais ou induzidas, no DNA, sendo refletidas nos seus produtos, podem ser detectadas eletroforéticamente. Deste modo, as variações protéicas seriam reflexos de diferenças genéticas (SMITHIS, 1955; HUNTER; MARKET, 1957).

Com a descoberta da enzima polimerase (introduzida por SAIKI et al., 1985), foi possível a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), que amplifica em milhares de cópias, um segmento específico de DNA, *in vitro*. A técnica de PCR envolve três etapas: denaturação do DNA, anelamento dos primers e extensão do DNA, sendo cada etapa realizada em uma temperatura diferente (VANBRUNT, 1990).

Kambhampati et al. (1992) apontam uma técnica da Biologia Molecular – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – como um método de identificação

de espécies, principalmente nos casos em que os caracteres morfológicos não permitem uma identificação rápida e exata.

Sua utilização apresenta, entre outros, os seguintes pontos positivos: 1) relativa simplicidade e rapidez na sua realização; 2) seu baixo custo quando comparada a outras técnicas moleculares, como RFLPs (análise dos polimorfismos de fragmentos de DNA obtidos através do tratamento do DNA com enzimas de restrição); 3) análise de segmentos seqüenciados e 4) a necessidade de pequenas quantidades de DNA (LANDRY, 1993). Além disso, ela é facilmente adaptável à maioria dos laboratórios, não requer o uso de isótopos (BLACK, 1993) e o trabalho pode ser feito sem qualquer conhecimento prévio de seqüências de DNA ou de genes do organismo de interesse (HAYMER; McINNIS, 1994).

Hadrys et al. (1992) sugerem que técnicas de RAPD podem ser usadas em ecologia molecular para determinar parentesco entre grupos relacionados, análise de genomas mistos na obtenção de provas para identificações específicas.

A técnica RAPD foi utilizada por Kambhampati et al. (1992) para identificação de espécies e para a diferenciação entre populações coespecíficas de mosquitos da família Culicidae.

Carter et al. (1996), investigando as relações filogenéticas entre populações de besouros (*Tomicus piniperda*) da América do Norte, utilizaram uma estratégia de mistura, em que vários indivíduos de uma população foram misturados para a extração de DNA, produzindo uma amostra de genomas múltiplos. Desta forma, o resultado da RAPD é mais conservativo, pois as variações individuais são diluídas.

Ribeiro (2001) utilizou a técnica de RAPD testando vários primers para distinguir gêneros e espécies próximas de Termitidae (Isoptera, Insecta). Dos oito primers utilizados, apenas três permitiram amplificações de DNA para as catorze espécies estudadas. Com os resultados foi gerada uma matriz de similaridade na qual houve o grupamento de duas espécies de *Embiratermes* e duas de *Cornitermes* e o grupamento do gênero *Heterotermes*.

Apesar dessa técnica ter mostrado eficiência para distinção de espécies de diferentes organismos, alguns autores apontam limitações no seu uso (SMITH et

al, 1994; RIESEBERG, 1996; BLACK, 1993). Porém autores apontam que os problemas podem ser minimizados quando estabelecido um protocolo na realização a análise.

Material e Métodos

III- MATERIAL E MÉTODOS

III. 1- Material

As espécies utilizadas para o desenvolvimento desse projeto foram coletadas no Campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e no Campus da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/ Rio Claro). As coletas foram realizadas entre os meses de Outubro a Março (1998, 2002, 2003, 2004 e 2005), período de altas temperaturas e maior umidade, fatores estes que possibilitam maior atividade dos organismos.

III. 2- Métodos

III.2.1- Análise morfométrica

Foram utilizados 57 machos e 46 fêmeas de indivíduos do gênero *Rhinocricus*, analisados sem serem identificados em espécie, sendo tratados como um único grupo, separados de acordo com a coloração, em claros, médios e escuros.

Destes organismos foram obtidas medidas do diâmetro do corpo, do comprimento total e contados o número de diplosegmentos de machos e fêmeas.

Nos machos, além das medidas citadas acima, foram utilizados os gonopódios anterior e posteriores. Estas estruturas foram montadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em microscópio Axioskop com sistema Axiohome.

Os dados obtidos dessas mensurações foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o pacote estatístico SPSS 11.0 e análise canônica utilizando o pacote SAS e dentre este, o teste Hotelling-Lawley Trace. A distância generalizada de Mahalanobis (D^2) também foi utilizada para estimar as distâncias entre os grupos de diplópodos de diferentes colorações.

Para análise do número de cones apicais, presentes no oitavo artigo da antena, 45 espécimens foram também separados de acordo com a coloração, e não foram identificados em espécies.

As antenas foram retiradas, limpas em uma solução com 5mL de água e 5 gotas de limpador concentrado “limpeza pesada” sob ultrassom por 5 minutos. Então foram desidratadas em acetona 50, 70, 75, 90, 95 e 100% (duas vezes), submetidas ao ponto crítico e montadas em stubs de alumínio, cobertas com ouro e analisadas sob microscópio eletrônico de varredura Philips (SEM 505).

O número de cones apicais de 15 espécimens de cada classe de coloração foi submetido à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Kruskal-Wallis.

III.2.2- Preparações cromossômicas

Os indivíduos foram mantidos em jejum por uma semana e em seguida injetou-se colchicina 0,08%. Após 16 horas (overnight) os espécimens foram dissecados e as gônadas e intestino médio retirados, hipotonizados em água de torneira por 10 minutos e em seguida fixados em Carnoy I (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético glacial). As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento em ambos materiais. O material a ser analisado foi deixado em ácido acético 45% por 15 minutos. Em seguida, o material foi transferido para a lâmina, que também continha uma gota de ácido acético 45%, e macerado com bastão de metal.

Coloração Convencional

As lâminas previamente confeccionadas conforme descrito, foram coradas com solução Giemsa 3% por 5 minutos.

Bandamento C

- a) depois de envelhecida por uma semana, colocou-se a lâmina por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente;
- b) lavou-se rapidamente em água destilada à temperatura ambiente;
- c) passou-se a lâmina em solução de hidróxido de Bário à 60° C, por 5 segundos;
- d) lavou-se rapidamente em HCl 1N à 60° C;
- e) lavou-se novamente em água destilada à temperatura ambiente;
- f) incubou-se a lâmina em 2XSSC à 60° C por 30 minutos;
- g) lavou-se em água destilada;
- h) corou-se com solução Giemsa 3%, por 5 minutos.

Marcação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) pelo íon prata

- a) pingou-se sobre a lâmina 1 gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 mL de água destilada + 0,5 mL de ácido fórmico) mais duas gotas de solução de nitrato de prata 50% e cobriu-se com lamínula de forma a homogeneizar a mistura;
- b) incubou-se em câmara úmida à 60° C por 3 a 5 minutos;
- c) lavou-se em água destilada à temperatura ambiente.

III.2.3- Análise Citogenética

Foi analisado o maior número possível de núcleos mitóticos e meióticos. Alguns núcleos foram selecionados e fotografados para a devida documentação dos resultados.

A caracterização dos cromossomos foi feita de acordo com Guerra (1986).

III.2.4- Documentação e análise dos resultados

O filme empregado na documentação dos dados citogenéticos foi o Imagelink, revelado em D-72, diluído em água na proporção 1:4 e fixado em F5.

As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodabrome Print RC F3 (Kodak), reveladas em D-72, diluído em água na proporção 1:2 e fixadas em F5.

III.2.5- Marcadores Moleculares

As extrações do DNA foram realizadas, a partir de espécimens fixados em álcool 80% e armazenados a -20°C (em freezer), com a utilização de TNES (Tris-NaCl-EDTA-SDS). Foi utilizado o tecido muscular dos indivíduos.

O protocolo de extração foi elaborado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro. Em eppendorf de 1,5mL, colocou-se 50µL de TNES gelado e o tecido foi macerado com uma ponteira de 1mL (com ponta

fechada em chama); essa maceração foi realizada no gelo para evitar a degradação do DNA; acrescentou-se 500µL da mesma solução gelada e ainda 3µL de proteinase K; incubou-se as amostras por 3 horas a 55°C; após as amostras voltarem a temperatura ambiente foi adicionado 200µL de NaCl 5M. Essa mistura foi agitada no Vortex por 20 segundos em alta velocidade e centrifugada a 15000g por 5 minutos, para a precipitação de proteínas; o sobrenadante foi transferido para um eppendorf novo contendo 600µL de isopropanol. O eppendorf foi invertido cuidadosamente 50 vezes e centrifugado a 15000g por 3 minutos para precipitação do DNA. O sobrenadante, desta vez, foi descartado em bomba de vácuo e foi acrescentado 600µL de etanol 70%; o eppendorf foi invertido 30 vezes e novamente centrifugado a 15000g por 3 minutos; cuidadosamente descartou-se o etanol na bomba de vácuo e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente para secagem. Para hidratação do material, foi utilizado 40µL de “DNA Hydratation Solution” (Tampão T.E.). O material foi armazenado em geladeira a 4°C.

A verificação da extração do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% submetida a 100V, 50 mA, durante 30 minutos. A quantificação foi feita em fluorímetro e a concentração, das amostras utilizadas, foi diluída para 60ng/µL.

As reações de PCR foram realizadas em uma termo-cicladora MJ (PTC 200), programada da seguinte forma: 92°C, 4 minutos; 45 ciclos de 92°C, 20 segundos, 37°C, 20 segundos, 72 °C, 6 minutos. As reações foram realizadas a partir do kit denominado “Ready to Go” (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), onde foi acrescentado 9µL de água miliQ autoclavada, 1,2µL de primer e 1µL da amostra de DNA, totalizando um volume de aproximadamente 11µL (concentração final de 0.7 unidades de Taq DNA Polimerase, 10mM Tris-HCl pH9,0, 50mM MgCl₂ e 200µM de cada dNTP).

Foram testados primers da Operon Technologies da série OPM e OPV.

As amplificações foram visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% submetida a 80V, 40mA, durante 90 minutos. Para a análise dos

fragmentos de DNA, foi utilizado o padrão: “100 bp DNA Ladder” (da Life Technologies). O ladder (L 100) possibilita a leitura de bandas de 100 a 1500 pares de bases, consistindo de 10 fragmentos de tamanhos múltiplos de 100 pares (1^0 fragmento= 100pb, 2^0 = 200pb,....., 8^0 = 800pb, analisando o gel a partir do fragmento mais livre). Portanto, foram analisadas bandas que estiveram entre 100 a 1500pb de tamanho, ficando excluídos da análise os demais fragmentos.

Os géis de agarose foram fotografados e analisados pelo programa “1D Image Analysis Software” (Kodak). Este programa utiliza os fragmentos de tamanhos conhecidos (ladder) como parâmetros para analisar e quantificar os tamanhos das bandas obtidas pela RAPD.

Os resultados foram analisados pelo programa PAUP 3.1. A presença ou ausência dos fragmentos polimórficos, codificados por 1 e 0 respectivamente, foi considerada como caráter independente. A análise de distância foi determinada através da técnica UPGMA.

Resultados

IV. Resultados

Os resultados estão apresentados na forma de capítulos em que cada um contém um artigo com os resultados das diferentes ferramentas utilizadas na análise dos indivíduos do gênero *Rhinocricus*.

A tese é composta por quatro capítulos, apresentando os seguintes artigos:

Capítulo 1:

Título do artigo: Morphometric analysis of a population of diplopods of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881.

Autores: Izabela Braggião Calligaris; Lílian Boccardo; Marcos Rogério Sanches; Carmem Silvia Fontanetti

Periódico: Folia Biológica (Praha)

Situação: já publicado

Capítulo 2:

Título do artigo: Variability in the number of antennal apical cones in the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881 (Diplopoda: Rhinocricidae).

Autores: Izabela Braggião Calligaris; Marcos Rogério Sanches; Carmem Silvia Fontanetti

Periódico: Zoomorphology

Situação: Submetido

Capítulo 3:

Título do artigo: Uso de marcadores RAPD para caracterizar espécies simpátricas do gênero *Rhinocricus* Karsch, 1881 (Diplopoda: Rhinocricidae).

Autores: Izabela Braggião Calligaris; Vanderlei Martins; Carmem Silvia Fontanetti

Periódico: Genome

Situação: a ser submetido

Capítulo 4:

Título do artigo: Análise citogenética de duas espécies simpátricas do gênero *Rhinocricus* Karsch, 1881 (Diplopoda: Rhinocricidae).

Autores: Izabela Braggião Calligaris; Carmem Silvia Fontanetti

Periódico: Caryologia

Situação: a ser submetido

Capítulo 1

**Morphometric analysis of a population of diplopods of the genus
Rhinocricus Karsch, 1881.**

Izabela B. Calligaris¹; Lilian Boccardo²; Marcos Rogério Sanches³; Carmem S. Fontanetti¹

1- Departamento de Biologia- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP; 2- Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié/BA; 3- Instituto de Matemática and Estatística- Universidade de São Paulo/ SP.

ABSTRACT: Diplopods belonging to the subclass Helminthomorpha may present one or both leg pairs of the seventh diplosegment modified into structures that aid copulation, called gonopods. These structures are used as a taxonomic trait for the description of most species. In the genus *Rhinocricus* these structures are closely similar, so that it is difficult to distinguish species only on the basis of this trait. Two species, *R. padbergi* and *R. varians*, are found in the same habitat and present gonopods practically identical in shape; together they present a broad color gradient, ranging from dark brown to light beige. Morphometric data for individuals of the experimental group were submitted to ANOVA (analysis of variance) and MANOVA, using Hotelling-Lawley Trace and generalized Mahalanobis distances (D^2) tests. The results demonstrated a relationship between size and color, with darker individuals being larger. On the basis of this preliminary analysis, we may suggest that the two species are distinct since dark individuals are distant from medium- and light-color individuals according to the D^2 values. This seems to indicate a possible polymorphism of individuals belonging to *R. padbergi* which present close proximity in the values obtained. In all analyses, we observed that the main variables were diameter, length and telson size.

KEYWORDS: Diplopoda, *Rhinocricus*, morphometry, multivariate statistic, taxonomy.

INTRODUCTION

Diplopoda are popularly known in Brazil as piolhos de cobra, embuás, gongos, gôngolos or millipeds. They vary in length from 2 mm to 30 cm and range in color from black to brown, with some species being red or orange.

According to GOLOVATCH et al. (1995), the group is estimated to comprise 80,000 species, this being the third largest class of Arthropoda after Insecta and Arachnida. Only about 10 to 15% the species of these estimative has been described, including approximately 2,500 genera and 16 families (GOLOVATCH, 1997). The taxonomy of this group is confused in certain families and genera. The most commonly used traits are color, and configuration of segments and gonopods; the latter two are quite similar in some groups, being unfeasible to utilize them as specific traits. Within this context, we may cite the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881.

Two species of this genus, *R. varians* Brölemann, 1901 and *R. padbergi* Verhoeff, 1938, present great similarity in most of the diagnostic traits and are frequently found in the same habitat. This similarity impairs the identification of these species since their gonopods are practically identical. One of the traits used to differentiate these two species is color, with *R. varians* being darker than *R. padbergi*. (SCHUBART, 1951); however, when several animals are compared, independently of the age or the size, a color gradient ranging from dark brown to light beige is observed (Figure 1).

Rhinocricus varians was considered by Broelemann (1901) as variation of *Rhinocricus nattereri* Humbert & Saussure, 1870 (Schubart, 1951). In 1951, Schubart considered *R. varians* as a species, characterized by a dark brown color with shades of purple, metazonites lighter, antenna brown with last segments lighter, yellowish, legs chestnut-yellow, mean length of 73,5mm. Telson with a large and prominent pre-anal process. This trait was important to separate *R. varians* from *R. nattereri*, which does not present a prominent pre-anal process.

R. padbergi was also described initially as belonging to the *R. nattereri* group, but Schubart, elevated it to a species level in 1944. For this author, this species is easily recognized when alive by its chestnut-pink to acajou color, telson darker and legs and antennae golden yellow-whitish. The mean length was 64,1mm (SCHUBART, 1951).

In the literature several papers utilize morphometric analysis associated with multivariate statistical analysis to identify taxa, dimorphism between individuals, etc (CHAUD, 1973; FORTUNER, 1991; MAPATUNA-YASANTHA, 2002; PERUQUETTI, 2002). In this paper we used a morphometric analysis, combined with multivariate statistical analysis to verify whether there was one or more species in the test group.

In this context, among the tests used were: the Hotelling-Lawley Trace test, developed by Lawley (1938) and modified by Hotelling (1951), and the generalized Mahalanobis D^2 distance. In the later, the numeric value of the maximum possible separation between two groups is called generalized distance between two groups; it measures, on an independent scale from the originally one used for the many traits, the clarity of the disjunction between them (PISANI, 1966). The D^2 value linking both groups is a pure number with properties of a common distance and it measures the extension of how they differ in shape and size (BARRACLOUGH AND BLACKITH, 1962).

MATERIAL AND METHODS

The specimens were collected in August 1998 at the Federal University of São Carlos (UFSCar), state of São Paulo, by Lilian Boccardo.

Due to the difficulty in identifying the species and the intermediated color gradient observed between them, we collected and analyzed diplopods, being careful to not identify them, treating them as one group.

Only adults, 57 females and 46 males, were used in the analysis. Body color of specimens was defined as light, medium or dark.

Diameter, total body length and and telson size were measured and the number of segments was recorded. The gonopods of all the males were removed and mounted on slides with synthetic resins, covered with coverslips and measured under an Axioskop microscope with the Axiohome system.

Regarding the anterior gonopod, we measured width, height and area (Figure 2); posterior gonopods measurements were: length of the thigh, telopodite and solenomerite (Figure 3).

The data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the SPSS 11.0 statistical package. Canonic analysis was also performed using the SAS package. The Hotelling-Lawley Trace test of this package was used to assess the differences in color classes. The generalized Mahalanobis D^2 distances were also estimated between diplopod groups of different colors.

RESULTS

To the variance analysis (ANOVA) the comparison of the data obtained in this paper, indicated significant differences in the variables studied with respect to color, both for males and females. The variables that most affected the results were length and diameter of the body and telson length. The results obtained showed that darker individuals had larger measurements. The F values obtained for the variable “number of segments” were non significant (Tables I and II).

We did not find any morphological differences among individuals based on the analysis of gonopod characters; we observed, that all variables, but thighs, are correlated to the animal’s color. As a rule, the darker the animal, the larger its body measurements (Tables III and IV).

A variance analysis (ANOVA) applied to the data for the traits analyzed taking into consideration the sex of the diplopods studied indicated that females had a larger body diameter than males and a larger number of segments. However, there was no difference between males and females regarding total body length or telson length (Tables V and VI).

Canonic analysis indicated that the first function was responsible for the variability detected among the three color classes, with 96.13% and 81.60% for males and females, respectively. We may also conclude that telson length, diameter and size were the variables that most affected the results obtained for males and females.

The Hotellin-Lawley Trace test detected differences between color classes, with a significant result for both males ($P= 0.013$; d.f.= 66) and females ($P=0.0001$; d.f.= 96).

Mahalanobis analysis demonstrated proximity between the light and medium color classes, with the dark class being more distant compared to the two previous ones. The values obtained can be visualized in Figure 4, which is an approximate graphic representation of the generalized Mahalanobis distances between the three color classes studied. The diagram in Figure 4A was constructed with the D values, i.e., the square root of D^2 , to establish a better proportionality between the points, facilitating the analysis and the understanding of the scheme.

DISCUSSION

Canonic analysis revealed a clear separation among the three color classes studied in the space created by the first function of the canonic variable, which corresponded to a large proportion of significant variance (96.13% for males and 81.60% for females).

Analyses of variance combined with D^2 values demonstrated that dark-colored individuals are statistically more distant, from light and medium-colored individuals. The later two are closer, and this might indicate a polymorphism regarding the coloration of individuals of *R. padbergi*.

The variance analysis taking into account gender indicated that females have a larger body diameter when compared to those of males, as well as a higher number of segments. This difference can be explained by the fact that females have ovaries containing ovocytes in different developmental stages increasing

body diameter (HOPKINS & READ, 1992, FONTANETTI & SAURENGO DA CUNHA, 1993; CAMARGO-MATHIAS et. al., 1998).

For both males and females, mean values of more than 7, 80, and 4 mm for diameter and length of the body and telson length seem to indicate a tendency to the darker color and may lead to the identification of animals of the species *R. varians* in the sampling obtained in the present study.

The morphometric multivariate techniques showed some combination of morphological traits can help at the identification of the species *R. padbergi* and *R. varians*. A similar research was developed by Calle et. al., 2002, with *Anopheles* females. They studied five species of the subgenus *Nyssorhyncus* and their results with multivariate analysis permitted identification of the species with 90% certainty and without ambiguities.

For the results obtained in morphometrical analysis used in this paper, observed that the size of the individuals are connected with the body color. This result confirms that dark animals have major dimensions compared with medium and light animals.

Based on the morphometric data and statistical analyses conducted in this paper, we conclude that there is a separation between different colored individuals. As mentioned elsewhere, light and medium colored individuals would belong to the species *R. padbergi*, presenting a color polymorphism among individuals. Dark-colored individuals would belong to the species *R. varians*, in agreement with the description by Schubart (1951), where the individuals of this species are larger in size (mean of the 73,5mm length) when compared to those of *R. padbergi* (mean of the 64,1mm length).

To the present, due to the few studies conducted with this group, it has not been possible to define what factors could generate the polymorphism observed in *R. padbergi*.

Acknowledgments: We are grateful to Profs. Drs. Antonio Carlos Simões Pião and Maria Lúcia Lorenzetti Wodewotzki for help with the statistical analyses

and with the interpretation of the results, to Prof. Dr. José Chaud Neto for his attention and help in the execution of this study, to Cristiane Mileo for help with the preparation of graphs and figures, to Aldo Calligaris Neto for help with preparation of tables, and to CNPq for financial support.

REFERENCES

- BARRACLOUGH, R. & BLACKITH, R.W. (1962). Morphometric relationships in the genus *Ditylenchus*. *Nematologica*, 8: 864-865.
- CALLE L., D.A. et al. (2002) Morphometric discrimination of females of five species of anophelids of the subgenus *Nyssorhynchus* from southern and northwest Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97(8): 1191-1195.
- CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. & MICÓ- BALAGUER, E.(1998) Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae) *Cytobios*, 94: 169-184.
- CHAUD NETTO, J. (1973) Machos diplóides de *Apis mellifera*- sua bionomia e contribuição ao problema da determinação do sexo. Tese apresentada ao Departamento de Genética e Matemática aplicada à Biologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP/SP 1973, 140p.
- FONTANETTI, C.S. & STAURENGO DA CUNHA, M.A.(1993) Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae) *Rev. Bras. Biol.*, 53 (1): 7-12.
- FORTUNER, R; MAGGENTI, A.R. (1991) A statistical approach to the objective differentiation of *Hirschmanniella oryzae* from *H. belli* (Nemata: Pratylenchidae) *Revue de Nematologie*, 14, (1): 165-180.
- GOLOVATCH, S.I.; HOFFMAN, R.L.; ADIS, J.; MORAIS, J.W. (1995) Identification plate for the millipede orders populating the neotropical region south of Central Mexico (MYRIAPODA, DIPLOPODA) *Studies on neotropical Fauna and Environment*, 30(3): 159-164.

- GOLOVATCH, S.I. (1997) On the main patterns of millipede diversity in Eurasia. *Senckenbergiana biológica*, 77(1): 101-106.
- HOFFMAN, R.L. (1999) Checklist of the millipeds of north and middle America. Virginia Mus. Nat. Hist. Special Publ. 8, Martinsville, 584p.
- HOPKIN, S.P. & READ, H.J. (1992) **The biology of millipedes** Oxford, Oxford University Press, 233p.
- MAPATUNA-YASANTHA et al. (2002) Unravelling the taxonomic status of the genus *Cynopterus* (Chiroptera: Pteropodidae) in Sri Lanka by multivariate morphometrics and mitochondrial DNA sequence analysis, *Mammalian-Biology* (print), 67 (6): 321-337.
- PERUQUETTI, R.C. (2002) Dimorfismo entre machos de *Euglossa mandibularis* Friese (Apidae, Euglossina), *Rev. Bras. . Zool.* 19(4): 1223-1226.
- PISANI, J. F. et al. (1966). Análise estatística da estrutura interespecífica dos *Bombus* do Brasil, *Zoológica*, 2(8): 101-120.
- SCHUBART, O. (1944). Os Diplopodas de Pirassununga, *Acta Zool. Lilloana del Instituto "Miguel Lillo"*, 2: 321-440.
- SCHUBART, O. (1951) Contribuição para a Fauna do Estado de São Paulo II. Os Rhinocricidae (Opisthospermophora, Diplopoda). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 23(2):. 221-275.

Table I: Mean values of the variables studied in male and female individuals of the genus *Rhinocricus*.

Sex	Variables	Color pattern	n	Mean value
Female	BODY DIAMETER	Light	12	5.8
		Medium	23	6.3
		Dark	22	7.3
		Total	57	6.6
	BODY LENGTH	Light	12	68.5
		Medium	23	69.2
		Dark	22	83.1
		Total	57	74.4
	LENGTH OF THE TELSON	Light	12	3.3
		Medium	21	3.1
		Dark	22	4.2
		Total	55	3.6
NUMBER OF SEGMENTS	Light	12	55.2	
	Medium	23	55.7	
	Dark	22	56.5	
	Total	57	55.9	
Male	BODY DIAMETER	Light	8	5.3
		Medium	23	5.9
		Dark	15	7.0
		Total	46	6.1
	BODY LENGTH	Light	8	59.0
		Medium	23	65.2
		Dark	15	81.7
		Total	46	69.5
	LENGTH OF THE TELSON	Light	8	3.1
		Medium	23	3.4
		Dark	15	4.1
		Total	46	3.5
NUMBER OF SEGMENTS	Light	8	54.3	
	Medium	22	53.5	
	Dark	15	54.7	
	Total	45	54.0	

Note: the mean values are reported as mm, except for the variable “number of segments”.

Table II: Analysis of variance of the values obtained for the variables studied in males and females of the genus *Rhinocricus* of light, medium and dark color.

SEXO			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
female	BODY DIAMETER	Between Groups	21,577	2	10,789	13,587	0,000
		Within Groups	42,878	54	0,794		
		Total	64,455	56			
	BODY LENGTH	Between Groups	2697,164	2	1348,582	12,099	0,000
		Within Groups	6018,731	54	111,458		
		Total	8715,895	56			
	LENGTH OF THE TELSON	Between Groups	12,334	2	6,167	20,095	0,000
		Within Groups	15,959	52	0,307		
		Total	28,293	54			
NUMBER OF SEGMENTS	Between Groups	17,03	2	8,515	1,562	0,221	
	Within Groups	296,339	54	5,488			
	Total	313,369	56				
male	BODY DIAMETER	Between Groups	19,007	2	9,503	14,078	0,000
		Within Groups	29,027	43	0,675		
		Total	48,034	45			
	BODY LENGTH	Between Groups	3548,632	2	1774,316	19,243	0,000
		Within Groups	3964,846	43	92,206		
		Total	7513,478	45			
	LENGTH OF THE TELSON	Between Groups	6,548	2	3,274	10,140	0,000
		Within Groups	13,883	43	0,323		
		Total	20,431	45			
NUMBER OF SEGMENTS	Between Groups	15,09	2	7,545	1,510	0,233	
	Within Groups	209,888	42	4,997			
	Total	224,978	44				

Table III: Mean values of the variables concerning the gonopods of male individuals of the genus “*Rhinocricus*”.

Variables	Color pattern	n	Mean value (mm)
HEIGHT OF THE GONOPOD	Light	8	2.1
	Medium	23	2.2
	Dark	15	2.4
	Total	46	2.2
WIDTH OF THE GONOPOD	Light	7	1.9
	Medium	23	2.0
	Dark	14	2.2
	Total	44	2.1
AREA OF THE GONOPOD	Light	7	4.1
	Medium	23	4.5
	Dark	14	5.5
	Total	44	4.8
LENGTH OF THE THIGH1	Light	8	1.0
	Medium	23	1.1
	Dark	14	1.1
	Total	45	1.1
LENGTH OF THE TELOPODITE1	Light	8	1.9
	Medium	23	2.1
	Dark	14	2.2
	Total	45	2.1
LENGTH OF THE SOLENOMERITE1	Light	8	1.8
	Medium	23	1.9
	Dark	14	2.0
	Total	45	1.9
LENGTH OF THE THIGH2	Light	6	1.0
	Medium	18	1.0
	Dark	13	1.1
	Total	37	1.1
LENGTH OF THE TELOPODITE2	Light	7	2.0
	Medium	19	2.0
	Dark	12	2.2
	Total	38	2.1
LENGTH OF THE SOLENOMERITE2	Light	7	1.8
	Medium	19	1.8
	Dark	12	2.0
	Total	38	1.9

Table IV: Analysis of variance of the data concerning the variables studied in male diplopods of the genus *Rhinocricus* considering three body color classes.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HEIGHT OF THE GONOPOD	Between Groups	0,631	2	0,316	6,868	0,003
	Within Groups	1,976	43	0,046		
	Total	2,607	45			
WIDTH OF THE GONOPOD	Between Groups	0,585	2	0,293	4,000	0,026
	Within Groups	2,999	41	0,073		
	Total	3,584	43			
AREA OF THE GONOPOD	Between Groups	13,256	2	6,628	7,633	0,002
	Within Groups	35,603	41	0,868		
	Total	48,859	43			
LENGTH OF THE THIGH1	Between Groups	0,078	2	0,039	0,582	0,563
	Within Groups	2,827	42	0,067		
	Total	2,905	44			
LENGTH OF THE TELOPODITE1	Between Groups	0,493	2	0,247	7,634	0,001
	Within Groups	1,357	42	0,032		
	Total	1,850	44			
LENGTH OF THE SOLENERITE1	Between Groups	0,241	2	0,120	3,955	0,027
	Within Groups	1,277	42	0,030		
	Total	1,518	44			
LENGTH OF THE THIGH2	Between Groups	0,157	2	0,079	1,954	0,157
	Within Groups	1,369	34	0,040		
	Total	1,526	36			
LENGTH OF THE TELOPODITE2	Between Groups	0,545	2	0,273	10,859	0,000
	Within Groups	0,879	35	0,025		
	Total	1,424	37			
LENGTH OF THE SOLENERITE2	Between Groups	0,426	2	0,213	6,621	0,004
	Within Groups	1,125	35	0,032		
	Total	1,551	37			

Table V: Descriptive analysis of the data obtained for four variables studied in male and female diploids of the genus *Rhinocricus*.

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper bound		
BODY DIAMETER	fêmea	57	6,569	1,073	0,142	6,284	6,854	4,3	10,3
	macho	46	6,150	1,033	0,152	5,843	6,456	4,0	8,5
	Total	103	6,382	1,071	0,106	6,172	6,591	4,0	10,3
BODY LENGTH	fêmea	57	74,42	12,476	1,652	71,11	77,73	52	120
	macho	46	69,52	12,922	1,905	65,68	73,36	45	100
	Total	103	72,23	12,849	1,266	69,72	74,74	45	120
LENGTH OF THE TELSON	fêmea	55	3,59	0,724	0,098	3,39	3,78	2	5
	macho	46	3,54	0,674	0,099	3,34	3,74	3	5
	Total	101	3,57	0,698	0,069	3,43	3,71	2	5
NUMBER OF THE SEGMENTS	fêmea	57	55,89	2,366	0,313	55,27	56,52	46	60
	macho	45	54,02	2,261	0,337	53,34	54,70	49	58
	Total	102	55,07	2,491	0,247	54,58	55,56	46	60

Table VI: Analysis of variance of the values obtained for four variables studied in males and females of the genus *Rhinocricus* taking into consideration the sex of the diplopods.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BODY DIAMETER	Between Groups	4,477	1	4,477	4,020	0,048
	Within Groups	112,489	101	1,114		
	Total	116,966	102			
BODY LENGTH	Between Groups	611,035	1	611,035	3,803	0,054
	Within Groups	16229,373	101	160,687		
	Total	16840,408	102			
LENGTH OF THE TELSON	Between Groups	0,057	1	0,057	0,116	0,734
	Within Groups	48,725	99	0,492		
	Total	48,782	100			
NUMBER OF THE SEGMENTS	Between Groups	88,173	1	8,173	16,379	0,000
	Within Groups	538,346	100	5,383		
	Total	626,519	101			



Figure 1. Colour gradient in specimens of *Rhinocricus* sp.

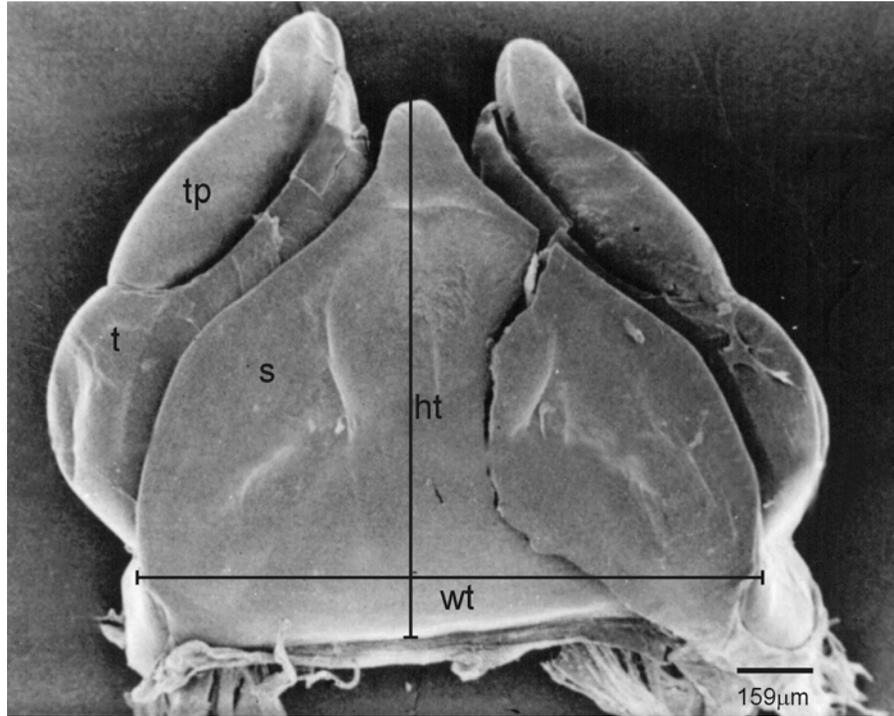


Figure 2. Anterior gonopod of *Rhinocricus* sp.: ht, height, s, sternite, t, thigh, tp, telopodite, wt, width.

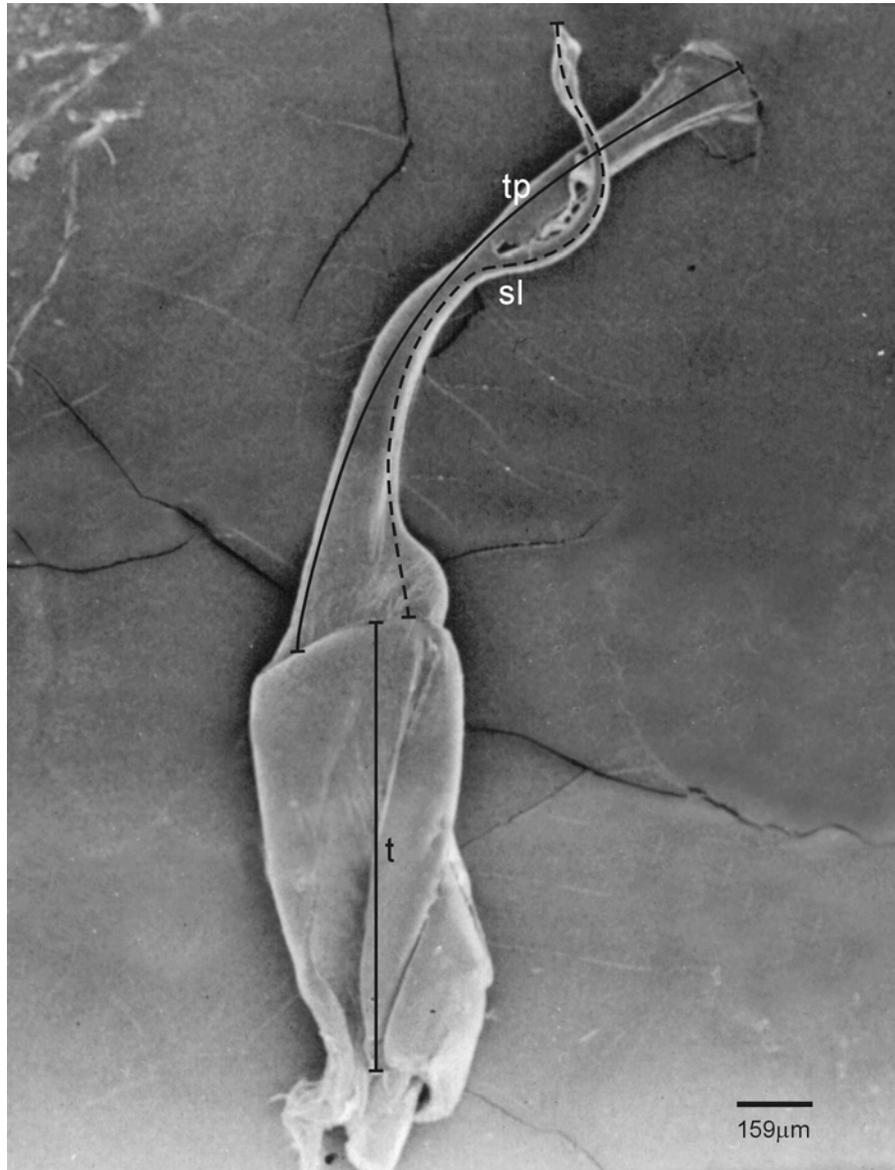


Figure 3. Posterior gonopod of *Rhinocricus* sp.:sl, solenomerite, t, thigh, tp, telopodite.

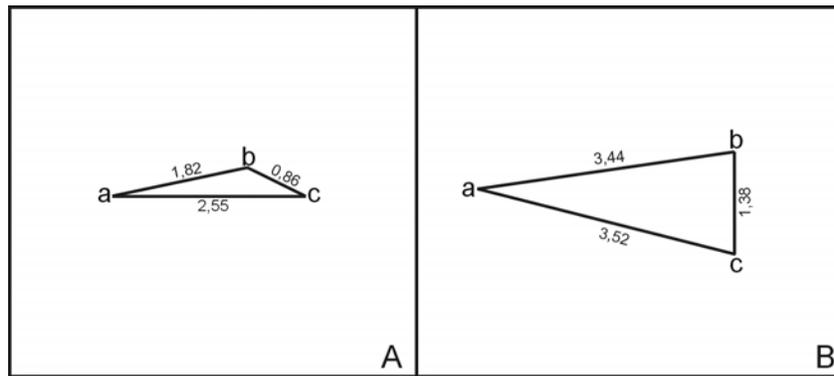


Figure 4. Graphic presentation of the values of the generalized Mahalanobis distances: A: values reported as $\sqrt{D^2}$ for males; B: values obtained for females, a, dark individuals; b, medium; c, light.

Capítulo 2

**Variability in the number of antennal apical cones in the genus
Rhinocricus Karsch, 1881 (Diplopoda: Rhinocricidae)**

Izabela Braggião Calligaris¹, Marcos Rogério Sanches², Carmem S. Fontanetti¹

1-Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil.

2- Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Izabela Braggião Calligaris,
Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)
Avenida 24A, n. 1515- CEP: 13506-900, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Tel.: (55) 19-3526-4139, Fax: (55) 19-3526-4136

E-mail: belabraggi@yahoo.com.br

Abstract

Two species from the genus *Rhinocricus*: *Rhinocricus padbergi* and *Rhinocricus varians* present very similar diagnostic features, such as external morphology, gonopodium, antennae and leg's coloration. When both species are placed together, they present a body color gradient ranging from dark brown to light beige. The body coloration is one of the features used to identify them: *R. varians* is darker than *R. padbergi*. To carry out the present work, we divided the individuals into dark, medium and light brown classes and the number of apical cones present on the eighth antennal segment was counted within each group. By using statistical analysis, it was verified whether this could be a helpful feature in the identification of these species or not, since, according to previous reports, the number of apical cones should be constant within a species. Individuals were analyzed as a single group, not based on species discrimination, but on color pattern. The present results suggested that, despite of a variation in the number of apical cones (13 to 36), independently on the coloration, dark individuals presented a higher number of apical cones than medium and light ones, being statistically separated from the latter one. Medium brown individuals didn't present statistical differences in relation to both dark and light individuals. Such results suggests that two species are likely to be present within the sampled group, *R. padbergi*, displaying a light coloration and *R. varians*, with a dark color pattern, whereas the medium brown individuals could putatively represent a color polymorphism in one of the analyzed species.

Key words: sensilla, Spirobolida, antennae, statistical analysis

Introduction

The antennae of Diplopoda are composed of eight segments bearing several sensorial structures, including taste and smell receptors that give the animals information about the environment. Among these sensorial structures, the most prominent ones are the apical cones, located on the eighth segment. They are contact chemoreceptors of additional tasting, smelling and tactile function (Nguyen Duy-Jacquemim, 1983, 1985, 1990, 1996, 1997).

Schubart (1951) stated that the antennae of diplopods comprise four or numerous sense cones, ranging from 10 to 100 or even more, but this number should be constant for each species. Nevertheless, an intra-specific variation was observed in ten individuals of a Spirobolidae species, *Rhinocricus padbergi* by Fontanetti and Camargo-Mathias (2004), where the number of apical cones ranged from 13 to 18. On the other hand, in a few species recently analyzed from other genera, these structures presented no numerical variation (Adis, 1989, Hopkin and Read, 1992, Nguyen Duy-Jacquemim, 1985, 1996, 1997).

The genus *Rhinocricus* comprises several species, bearing very similar diagnostic features, currently used to characterize the group, as for instance, the configuration of the gonopodium.

The species *Rhinocricus varians* Broelemann, 1901 and *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 are very similar and their precise identification is quite difficult. One of their distinctive features is the color pattern: *R. varians* is darker than *R. padbergi*. However, when many individuals are compared, it is possible to verify a color gradient, ranging from dark brown to light beige. In face of the difficulties in distinguishing the correct coloration pattern of each individual, they should be rather separated into dark, medium and light brown. Calligaris et al, 2005 mad a morphometric study with this genus, comparing diagnoses structures

with the body coloration between the species, *R. varians* and *R. padbergi*; the results showed a statistical difference where dark individuals was more distant compared with both light and medium one.

Therefore, the aim of this work was to analyze the number of apical cones within the three coloration classes prior to any species distinction between *R. padbergi* and *R. varians*, in order to verify if such feature could discriminate them at a specific level, since, according to previous reports in others species, this number must be constant within each one.

Material and Methods

The specimens of the genus *Rhinocricus* were collected at the Campus of Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – SP), in 1998, by Lilian Boccardo. The individuals were then separated into dark, medium and light brown.

The antennae were cleaned in a solution with 5mL water and 5 drops of hard cleaner under ultrasounds for five minutes. Then, they were dehydrated in acetone 50, 70, 75, 90, 95 and 100% (twice), submitted to the critical point, placed in aluminum stubs with an adhesive paper, covered with gold and analyzed under a scanning electronic microscope Phillips (SEM 505).

The number of apical cones of 15 specimens from each coloration class was submitted to analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis test.

Results

The antennae of *Rhinocricus* representatives present a short eighth segment, mostly inserted within the seventh one (Fig. 1). The apical cones are placed at the top of the VIII segment (Fig. 2) being this, the only antennal sensilla found in it.

The number of apical cones found in the analyzed animals was variable according to each coloration class, without any fixed pattern or mean value within them. The variation amongst all specimens ranged from 14 to 36 cones (light: minimum:15-maximum:22; medium: minimum:14-maximum:29; dark minimum:17-maximum:36)

Despite of a high number of cones have been lost during the technical process, their insertion sites were clearly identifiable (arrowheads in the figures 3, 4 and 5), allowing it to be counted. Cones bearing a typical appearance were counted (ac in the figures), as well as the smallest (empty arrows in Figures 3, 4 and 5) and those bearing malformations (full arrows in the Figure 3).

The present results allowed us to elaborate a histogram (Figure 6) showing the distribution of the number of apical cones found within the three coloration classes. A dark individual presented an extremely high number of apical cones (36) when compared to the others. Non parametrical statistical tests were then performed, such as median and Kruskal-Wallis (Table 1), whether including or not the data from the animal bearing 36 cones, and in both cases the results were significant. Such result demonstrates that there is a significant difference among the mean number of apical cones for each coloration pattern.

We observed that the mean number of apical cones increases according to coloration darkening (Table 2; Figure 7). Based on this increase, it would be interesting to test their significance by pairwise comparison, i. e., to test separately light and medium, medium and dark, and dark and clear brown animals, by using multiple comparisons tests. However, prior these tests, we carried out ANOVA analysis, although the data have presented some visual distortion in relation to the normal curve. The p-value was identical until the third decimal number to the p-value obtained by the non parametric test shown at table 1, indicating that ANOVA is reliable in this case. Then, multiple comparisons tests were performed using several methods (Duncan, Bonferroni, Tukey). In all tests, it was clear that the difference in the mean number of cones was significant only when we compared light and dark brown animals. The animals bearing a medium brown coloration

presented no significant differences regarding to the number of apical cones in relation to neither dark nor light brown ones.

Since the obtained values for the three coloration patterns, when related to the number of cones, were consistent, we believe that a statistical analysis taking into account a higher number of animals could certainly be more powerful and able to provide a better positioning for medium brown animals.

Discussion

The number of apical cones herein described was higher than that previously reported for the species *R. padbergi* (Fontanetti and Camargo-Mathias, 2004). However, in the latter one, the authors emphasized an intra-specific variation. These data are opposed to Schubart (1951), which suggested that the number of apical cones should be constant within a species.

Moreover, as far as we know, there are no reports about variation in the size or shape of apical cones such as those observed in the present study. These observations suggest some kind of malformation and/or development delays in these structures during molt.

After statistical analyses including or not the animal bearing a very high number of apical cones, it was verified that it was responsible for changing the mean values from dark brown animals, which have increased. But, when it was taken apart, the parametric test adopted still remained significant, demonstrating that, in fact, there is an increase in the number of apical cones within dark animals.

Although the data were slightly different from a normal distribution, the analysis of variance test (ANOVA) was employed to compare the results. It was therefore observed that the lack of normality has no influence on the final results, since both test provided similar results.

The results obtained from statistical test, coupled with coloration features, suggest the occurrence of two species within the surveyed group, and one of them

should be highly polymorphic with regards to coloration. The present data showed no statistical difference among the individuals bearing dark, medium and light brown coloration, indicating a continuous gradient in both coloration and number of apical cones. Thus, animals displaying a light coloration tend to belong to the species *R. padbergi* and those of dark coloration should belong to the species *R. varians*. Following this thought, the animals bearing a medium brown color would represent an intermediary range for both coloration and number of apical cones features, and species determination of medium brown animals based on either criterion would be unreliable. However, we have demonstrated that coloration is related to the number of apical cones, which it is also related to the species classification. This result accord with Calligaris et al, 2005. These authors found correlation between dimensions of the diagnoses structures with the body coloration, being dark individual bigger than light and medium one. Therefore, no matter whether the coloration is dark, medium or light brown, it is useful for species identification. Thus, it would be necessary more information to classify them correctly. Based on this, we suggest collecting more data to build a Discriminant Analysis model, which would include the animal coloration and the number of cones, since both information would help discriminate the animals from each group.

It must be taken into consideration that this result is mostly applicable to the studied group and a higher number of studies with representatives from this genus, collected at different regions in order to verify whether the variation in the number of apical cones observed in the present work is widely present or it is regionally restricted and influenced by environmental aspects, such as feeding habits, for instance.

The variation observed in the number of apical cones might be a characteristic of this group and the analysis of others species belonging to this genus would be necessary to achieve a better understanding of this variation. It should be pointed out that more than one species is likely to be present within the studied sample; such variability might represent a genus feature. Moreover, we

conclude that, in this population, the number of apical cones is variable within a species and, therefore, its utilization in species distinction is not recommendable. On the other hand, it supports the establishment of two valid species: *R. padbergi* and *R. varians*, whereas the coloration gradient observed between both of them could represent a specific polymorphism.

Acknowledgments: We are grateful to Antonio T. Yabuki for help with use of scanning electronic microscope, Monika Lamonte for help to material preparation, Cristiane M. Miléo for help with plates and to CNPq for financial support.

References

- ADIS, J. (1989) Illustrated key for neotropical Myriapoda (Arthropoda). Amazoniana, 10 (4): 353-360.
- CALLIGARIS, I.B.; BOCCARDO, L.; SANCHES, M.R.; FONTANETTI, C.S. (2005) Morphometric analysis of a population of diplopods of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881. Folia Biologica (Praha), 51, 40-46.
- FONTANETTI, C. S. & CAMARGO-MATHIAS, M.I. (2004) External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda, Spirobolida). Braz. J. Morphol. Sci., 21(2), 73-79.
- HOPKIN, S.P., READ, H.J. (1992) The biology of millipedes. Oxford. Oxford University Press.
- NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1983) Ultrastructure des organes sensoriels de l'antenne de *Polyxenus lagurus* (Diplopode, Penicillate). III. Les sensilles coeloconiques des 6e. et 7e. articles antennaires. Ann. des Sci. Natur. Zool., 13, 5, 207-220.
- NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1985) Ultrastructure des cônes sensoriels apicaux et des sensilles basiconiques spiniformes du 7e. article des antennes

- de *Typhoblaiulus lorifer* et *Cylindroiulus punctatus* (Diplopodes, Iulides). Ann. des Sci. Natur. Zool., 13, 7, 67-88.
- NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1990) Connaissances actuelles dèduites de l'étude ultrastructurale des sensilles, sur le rôle de l'antenne dans la perception des stimuli chez les myriapodes. In. Proc.of the 7th Intern. Congress of Myriap. (ed. Minelli, A.), pp. 97-108, E.J. Brill, 1990.
- NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1996) Comparative ultrastructure of the apical antennal cones of two blaniulids millipedes: the cavedwelling *Blaniulus lorifer* (Brolemann, 1921) and the edaphic *Blaniulus guttulatus* (Bosc, 1972). Mem. Biospeol., 23, 237-240.
- NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1997) Fine structure and possible functions of antennal sensilla in *Polyxenus lagurus* (Diplopoda, Penicillata, Polyxenidae). Ent. Scand. Suppl., 51, 167-178.
- SCHUBART, O. (1951) Contribuição para a Fauna do Estado de São Paulo II. Os *Rhinocricidae* (Ophisthospermophora, Diplopoda). Anais da Academia Brasileria de Ciências, 23 (2): 221-275.

Table 1. Results from the non parametric Kruskal-Wallis test

	Including the specimen with 36 cones	Excluding the specimen with 36 cones
Chi-Square	11.4	10.1
Df	2.0	2.0
Asymp. Sig.	0.003	0.006

Table 2. Mean number of cones per color pattern.

Coloration	Number of animals	Mean N of cones
Light	15	17.93
Medium	15	19.73
Dark	15	23.07
Total	45	20.24

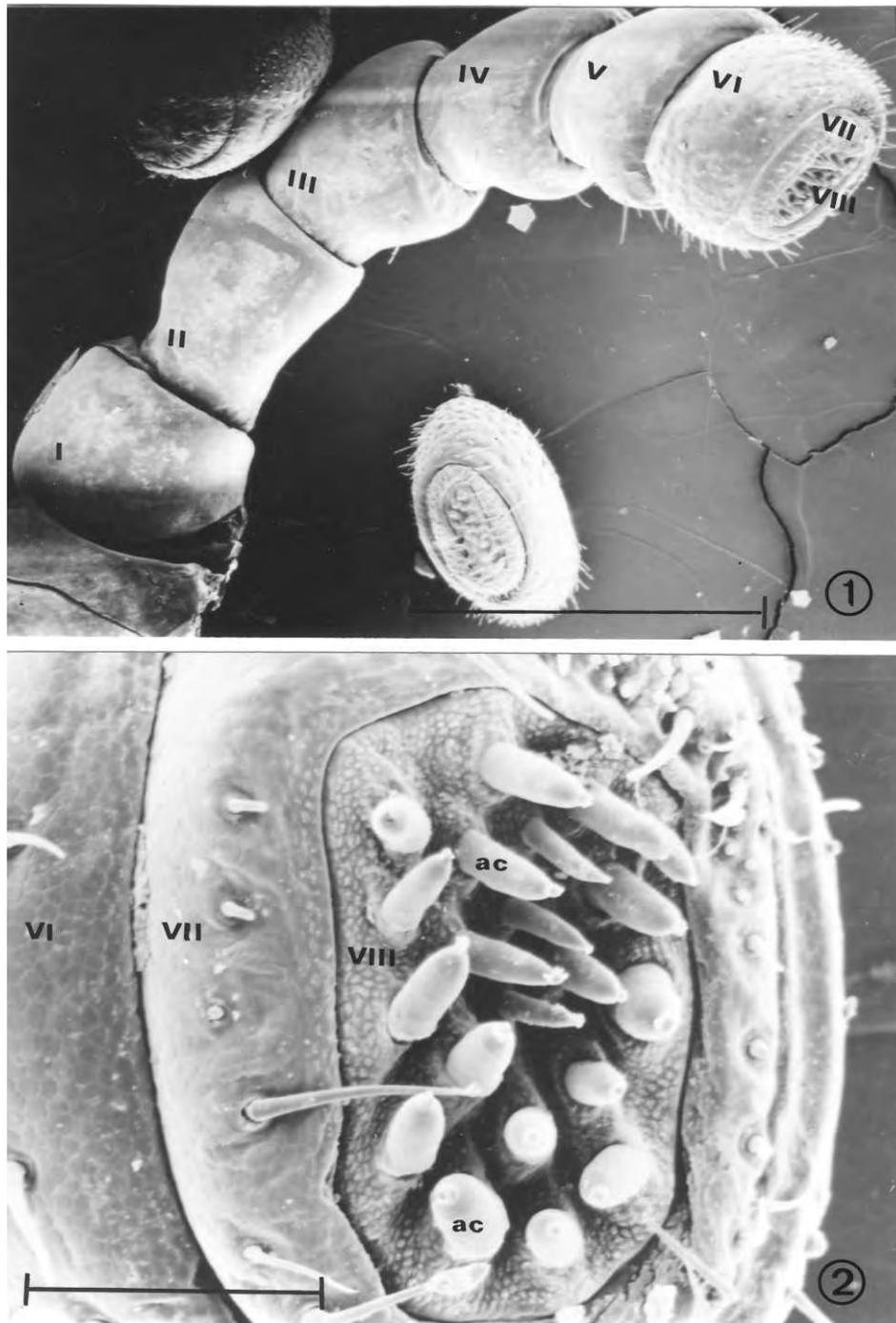
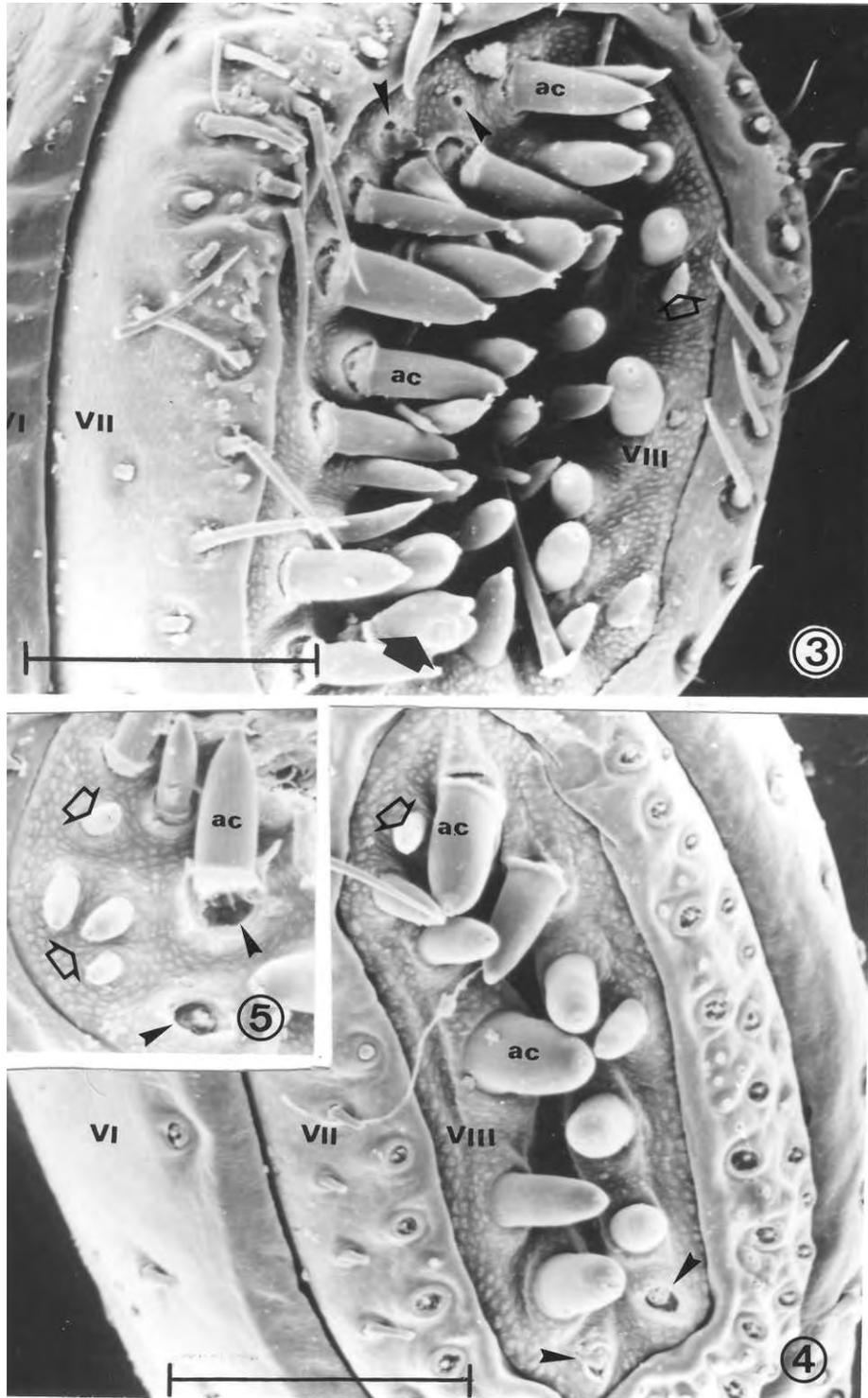


Figure 1. Overall view of the antennae of *Rhinocriscus* – numbered segments. **Figure 2.** Detail of apical cones from VIII segment.

ac= apical cones.

Scale: 1=1mm; 2= 0,1mm



Figures 3, 4, 5. Apical cones of *Rhinocricus*.

ac= apical cones; arrowheads = site of apical cone removing; empty arrows = smaller apical cones, quite different from the mean; full arrow= cone bearing an apparent malformation.

Scale= 0,1mm

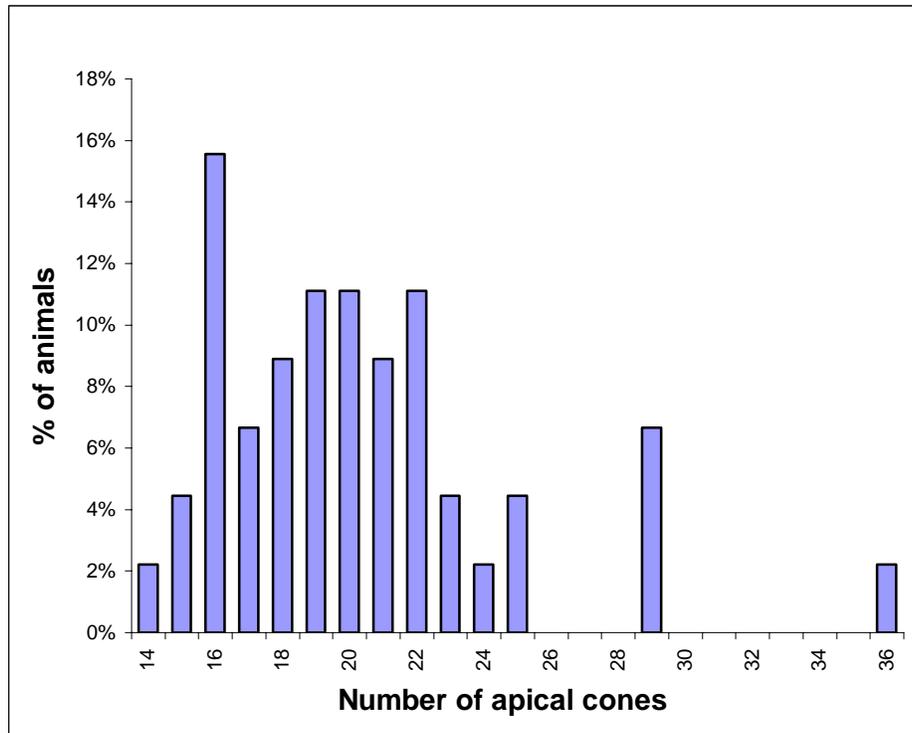


Figure 6. Proportion of animals bearing the number of apical cones found in individuals of the genus *Rhinocricus*.

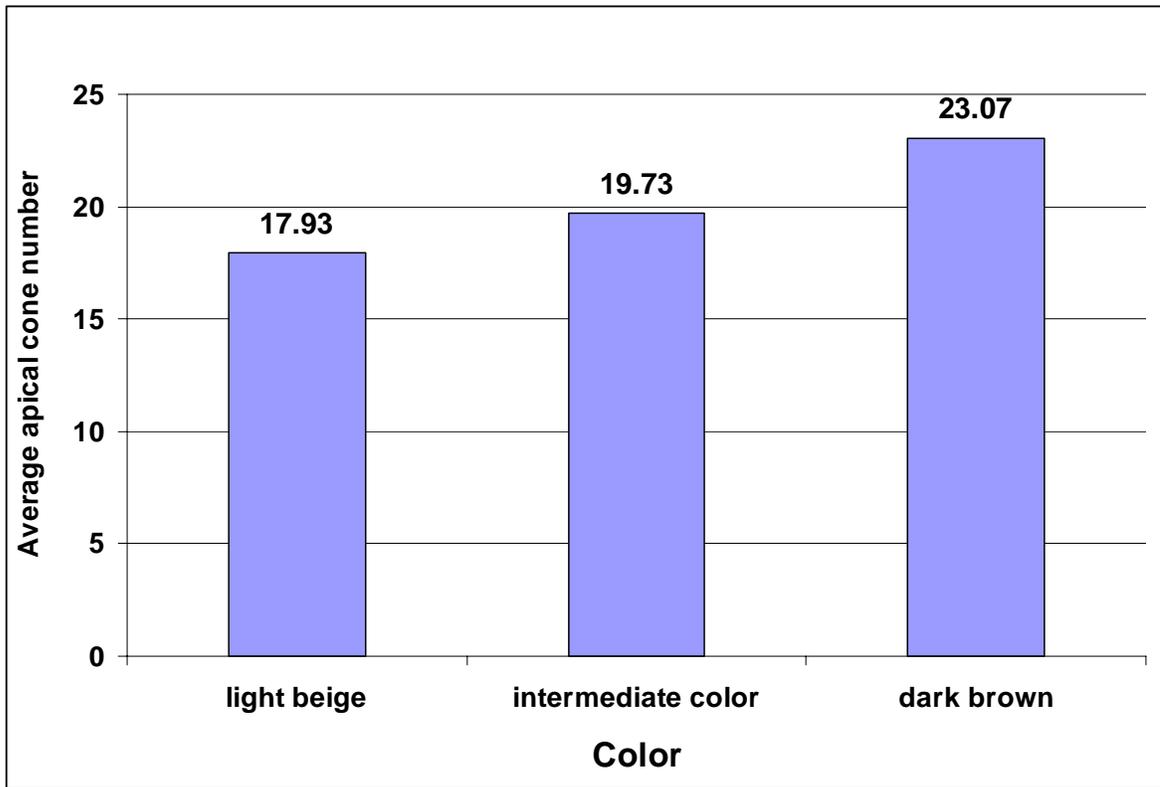


Figure 7. Bars grafic showing the mean number of cones per color pattern

Capítulo 3

Uso de marcadores RAPD para caracterizar espécies simpátricas do
gênero *Rhinocricus* Karsch, 1881 (Diplopoda:Rhinocricidae)

Calligaris, I. B.¹, Martins, V. G.², Fontanetti, C. S.¹

1- Departamento de Biologia – UNESP Rio Claro/SP

2- CEIS- Centro de Estudos de Insetos Sociais- UNESP Rio Claro/SP

Running title: Uso de marcadores RAPD em *Rhinocricus* (Diplopoda)

Autor correspondente: Izabela Braggião Calligaris, Departamento de Biologia,
Instituto de Biociências- UNESP, Rio Claro/São Paulo. Avenida 24A, 1515- Bela
Vista, Rio Claro/ São Paulo- Brasil. CEP 13506-900
e-mail: belabraggi@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho teve por objetivo analisar um grupo de indivíduos do gênero *Rhinocricus*, encontrados no mesmo habitat e com caracteres morfológicos muito semelhantes. Quando juntos, apresentam um gradiente de coloração que vai do marrom escuro ao bege claro. O objetivo, utilizando a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), foi testar, se num grupo de indivíduos, coletados aleatoriamente, e sem prévia identificação da espécie, a coloração poderia auxiliar na identificação destes. Os indivíduos foram separados, segundo a coloração, em claros, médios e escuros. Foram utilizados três primers que geraram amplificação para todas as colorações. Essas bandas foram analisadas, e o tamanho foi obtido comparando-as com um ladder de 100bp. Pelos resultados, a coloração não auxilia na identificação desses organismos, uma vez que ocorreu grupamento de indivíduos claros com escuros e médios; houve quatro grupamentos de indivíduos com diferentes colorações e outros três organismos que permaneceram isolados, não se agrupando com nenhum outro; dentre estes, um se mostrou muito diferente no padrão de bandas geradas pela técnica. Pode-se sugerir que cada grupamento representaria espécies ou subespécies, ocorrendo então mais de uma espécie no grupo estudado. Foram utilizados dois organismos do gênero *Gymnostreptus* como grupo externo, o que foi evidenciado no fenograma.

Palavras-chave: Diplopoda, RAPD, *Rhinocricus*, UPGMA

Introdução

Os Diplopoda são popularmente conhecidos como piolhos-de-cobra, embuás, gongos, gôngolos e são denominados também como milípedes, em alusão ao grande número de pernas que possuem. O tamanho desses organismos pode variar de 2mm a 30cm de comprimento e a coloração varia do negro ao marrom, podendo apresentar tons vermelhos ou alaranjados.

A taxonomia deste grupo é confusa em determinadas famílias e gêneros, principalmente naqueles em que são observados caracteres morfológicos muito semelhantes. Neste contexto podemos citar o gênero *Rhinocricus*, descrito por Karsch, 1881.

Duas espécies desse gênero, *Rhinocricus varians* Broelemann, 1901 e *R. padbergi* Verhoeff, 1938, apresentam grande similaridade na maioria dos caracteres diagnósticos e são freqüentemente encontradas no mesmo habitat. Para diferenciação das duas espécies, um dos parâmetros utilizados é a coloração do corpo, sendo *R. varians* mais escuro que *R. padbergi*. Porém, quando comparados vários animais, observa-se um gradiente de coloração que vai do marrom escuro ao bege claro (CALLIGARIS et al., 2005; CALLIGARIS et al., dados não publicados).

Estudos prévios analisando a morfometria dos diferentes caracteres morfológicos utilizados na taxonomia clássica (Calligaris et al., 2005) e dos cones apicais antenais (Calligaris et al., dados não publicados) demonstraram correlação da coloração com o tamanho dos indivíduos e o número médio dos cones apicais com. Indivíduos escuros apresentaram dimensões maiores e maior número médio

de cones apicais, em relação aos indivíduos médios e claros, sendo os escuros, estatisticamente, mais distante em relação aos outros. Os autores mantiveram a classificação atual, sendo os indivíduos de coloração escura, *R. varians* e os de coloração média e clara *R. padbergi*; esta última espécie apresentaria portanto, um alto polimorfismo quanto ao caráter coloração.

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido utilizada como um método para identificação de gêneros e espécies, principalmente nos casos em que os caracteres morfológicos não permitem uma identificação rápida e exata (KAMBHAMPATI et al., 1992; LANDRY et al., 1993; HADRYYS et al., 1992; RIBEIRO, 2001).

O objetivo desse trabalho foi tentar por meio da técnica RAPD, verificar se os organismos *R. varians* e *R. padbergi* pertencem a uma única espécie altamente polimórfica, ou, a duas, como são atualmente classificadas.

Material e Métodos

Os diplópodos do gênero *Rhinocricus* foram coletados na cidade de São Carlos/SP em novembro de 2003 e março de 2004 e aqueles do gênero *Gymnostreptus* em abril de 2004, na cidade de Rio Claro, conforme Tabela I.

Foram utilizados 18 organismos (machos e fêmeas) de diferentes colorações, anotadas como clara, média e escura, do gênero *Rhinocricus*, além de dois organismos do gênero *Gymnostreptus*. Os organismos foram fixados em álcool 80% e mantidos em freezer a -20°C .

As extrações do DNA foram obtidas de tecido muscular retirado da parte interna do exoesqueleto. Para as extrações foi usado um “kit” produzido no laboratório de Biologia Molecular do CEIS-IB-Rio Claro, que consiste de uma solução de lise celular composta de TrisHCl-NaCl-EDTA-SDS, uma solução de precipitação de proteínas de NaCl 5M e uma solução de hidratação composta de TrisHCl-EDTA (TE). O protocolo foi ajustado para o material, conforme segue:

Em tubo Eppendorf de 1,5 ml, colocou-se 50 μ L de TNES e o tecido muscular dos animais, fragmentando com uma ponteira de 1 ml, fechada na ponta com chama. Essa fragmentação foi realizada em gelo para evitar degradação de DNA. Em seguida acrescentou-se mais 750 μ L da solução de TNES gelado e 5 μ L de proteinase K (20mg/mL). Esse material foi incubado em banho-maria por três horas a 55°C. Após a incubação, deixou-se a amostra voltar à temperatura ambiente e acrescentou-se 3 μ L de RNase A (4mg/mL) e incubou-se por mais 30 minutos em temperatura de 37°C. Após essa etapa, deixou-se a amostra voltar novamente à temperatura ambiente e acrescentou-se 280 μ L de NaCl 5M. Em seguida, agitou-se a mistura no Vortex por 20 segundos em alta velocidade e centrifugou-se a 15000g por 5 minutos para precipitação de proteínas; transferiu-se o sobrenadante para um novo Eppendorf contendo 600 μ L de isopropanol, o qual foi invertido delicadamente 50 vezes; centrifugou-se a 15000g por 3 minutos para precipitação do DNA. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 600 μ L de etanol 70%; inverteu-se 30 vezes o Eppendorf e centrifugou-se a 15000g por 3 minutos. Cuidadosamente, descartou-se o etanol sem deslocar o precipitado de DNA e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente para secar à temperatura

ambiente. Para hidratação do DNA utilizou-se 40 μL de tampão TE. O material foi armazenado em geladeira a 4°C.

Foi feita verificação da extração de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% submetido a 100V e 50mA, durante 30 minutos. A quantificação foi realizada em fluorímetro. As amostras foram diluídas para 60ng/ μL para serem utilizadas nas reações de RAPD.

As reações de PCR foram realizadas em termo-cicladora MJ (PTC 200), programada da seguinte forma: 92°C, 4 minutos, 45 ciclos de 92°C, 20 segundos, 37°C, 20 segundos, 72°C, 6 minutos. As reações de PCR foram feitas com volume final de 15 μL , com os reagentes nas seguintes concentrações: 10mM RTris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,7 U de Taq polimerase e 1,0 μL de cada primer. Em cada uma das reações foram usados 60ng de DNA genômico. Os primers testados, da Operon Technologies e suas seqüências encontram-se na Tabela II.

As amplificações foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% submetida a 80V, 40mA, durante 1:30h. Para análise dos fragmentos de DNA, foram utilizando o padrão: "100 bp DNA Ladder" (Promega).

Os géis de agarose foram fotografados e analisados pelo programa "1D Image Analysis Software" (Kodak). Este programa utiliza os fragmentos de tamanhos conhecidos (Ladder) como parâmetros para analisar e determinar os tamanhos das bandas obtidas pela PCR. Os dados foram analisados pelo programa Statistica for Windows 4.3, copyright Stat Soft, 1993, pela técnica UPGMA, distância Euclidiana, anotando a presença ou ausência dos fragmentos

polimórficos, codificados por 1 e 0 respectivamente, consideradas como caráter independente.

Resultados e Discussão

Durante o estudo foram selecionados três dos primers testados que geraram amplificações para todos os organismos estudados (Figura 1). Em conjunto, os primers geraram 45 fragmentos de diferentes tamanhos (Tabela III), que foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade (Tabela IV). Essa matriz permitiu a geração de um Fenograma (pela de análise UPGMA), que representa as distâncias entre os organismos (Figura 2).

A análise dos resultados obtidos revela que os espécimes estudados distribuem-se por quatro grupos principais, aqui designados de I a IV. O fenograma da Figura 2 mostra que o grupo I é formado pelos espécimes R13M, R12C, ambos espécimes fêmeas, mais próximos entre si e R9E, pouco mais distante, que é um espécime macho. O grupo II, por sua vez, é formado por R10C, R5C e mais distante R15M, sendo os três do sexo feminino. Quanto ao espécime R16M, fêmea, está próximo aos grupos I+II, mas não se incluindo em nenhum deles, e assim se encontra mais distante em relação aos grupos mencionados. O grupo III, por sua vez, é formado pelos espécimes R6M, fêmea, R4E, macho e mais distante R8M, também macho. Para o espécime R14E, fêmea, o fenograma indica que o mesmo se aproxima do conjunto que compreende o grupo III, e dos grupos I, II+R16M. O grupo IV, por sua vez, é composto por quatro espécimes: os espécimes mais próximos são R3C e R2E, uma fêmea e um macho,

respectivamente; o espécime R1E, macho, um pouco mais distante de R3C+R2E e finalmente R11E, macho, mais distante portanto, dos três anteriores. Finalmente, o fenograma permite inferir que o espécime R7M, fêmea, se distancia de todos os grupos anteriores, sendo, portanto, mais distinto geneticamente em relação a eles. Os espécimes G1 e G2, se agruparam e formaram uma ramificação mais distante em relação aos demais, o que era esperado, já que pertencem a outro gênero (*Gymnostreptus*) e foram aqui incluídas como espécimes externos em relação ao gênero *Rhinocricus*.

Os resultados obtidos, da análise dos espécimes estudados, demonstram que o grupo em questão se compõem de mais de uma espécie.

O fenograma revela ainda que a coloração não se apresentou como um caráter confiável para classificar os indivíduos do conjunto estudado. O grupo I é constituído por um espécime claro, outro médio e outro escuro; o II, por dois claros e um médio; o III por dois de coloração média e um escuro e o IV por três escuros e um claro. Fora dos agrupamentos, um médio e outro escuro. O espécime R7M, de coloração média, aparece isolado. Assim, há uma mistura relativa à coloração na amostra estudada. No grupo IV há uma aparente predominância de indivíduos escuros. Entretanto, o espécime R3C, de cor clara, está mais próximo geneticamente do R2E, escuro, ambos basais do grupo.

Dessa forma, os dados gerados pelos marcadores RAPD permitem inferir que possivelmente, a amostra total de *Rhinocricus* analisada seja composta por um complexo de espécies crípticas e talvez algumas subespécies, já que as distâncias observadas não são muito grandes.

Quando analisados os agrupamentos de I a IV, também pode-se sugerir que representem cada um deles, espécies distintas e possíveis subespécies. Os grupos I e II, relativamente próximos, têm em comum parentesco com o espécime R16M. O grupo III, tem também parentesco com o espécime R14E. Como se trata de espécies simpátricas, e embora não tenha sido possível analisar o comportamento reprodutivo desses organismos, parece-nos seguro inferir que seja possível que ocorram cruzamentos entre indivíduos dos grupos, o que explicaria o fato dos espécimes R16M e R14E localizarem-se fora dos agrupamentos, mas que possuem fragmentos comuns a pelo menos dois dos grupos.

Alguns autores, têm questionado a utilização desta técnica devido a possíveis interpretações erradas dos resultados, atribuídas a diferentes fatores; um desses questionamentos se deve a ocorrência de competição entre os fragmentos de RAPD, resultando em redução da amplificação de fragmentos que não apresentaram pareamento perfeito. Este fato levaria a uma contagem inadequada das bandas de fragmentos homólogos, já que a presença ou ausência de uma banda em particular pode ser resultante de competição com outros fragmentos polimórficos, ao invés de ser resultado de mudança de sítio de pareamento (WILLIAMS et al., 1993; SMITH et al., 1994).

Porém esses problemas apontados podem ser minimizados, se forem testados maior número de primers, que assim vão gerar um maior número de fragmentos amplificados. O aumento na quantidade de informações, nessas situações, quando analisadas em conjunto, conduz a uma diluição dos diversos

problemas que ocorrem, permitindo assim uma análise mais apurada das distâncias genéticas entre espécies (ou populações) analisadas.

Em contrapartida, Haymer; McInnis (1993) utilizaram três primers para identificar polimorfismos de DNA em *Ceratitis capitata* para atuar como marcadores genéticos. Os resultados demonstraram a eficiência do método, que permite a detecção de diferentes níveis de diferenciação populacional, podendo identificar até mesmo moscas de uma determinada localidade geográfica, ou distinguir populações de laboratório e de campo.

No mesmo sentido, Rout (2006) aplicou a técnica de RAPD para avaliar a relação genética de três espécies de *Typhonium* e comenta que com esta técnica é possível diferenciar claramente todas as espécies desse gênero.

A técnica foi útil no intuito de salientar a alta diversidade genética que o grupo apresenta, mas não se mostrou satisfatória como ferramenta taxonômica aplicada no reconhecimento das espécies *R. varians* e *R. padbergi*, Os dados permitiram verificar que o grupo apresenta mais de uma espécie concordando com os dados previamente obtidos por CALLIGARIS et al., 2005.

Agradecimentos: Agradecemos à colaboração do Prof. Dr. Odair Correa Bueno na análise dos resultados obtidos, ao CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) pela utilização do Laboratório de Biologia Molecular, a Cristiane M. Miléo pelo auxílio na parte gráfica e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

BLACK, W. C. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology**. v. 2, n. 1, p. 1-6, 1993.

CALLIGARIS, I.B.; BOCCARDO, L.; SANCHES, M.R.; FONTANETTI, C.S. Morphometric analysis of a population of diplopos of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881. *Folia Biologia (Praha)*, 51, 40-46, 2005.

HADRY, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 55-63, 1992.

HAYMER, D. S. ; McINNIS, D. O. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. **Genome**, v. 37, p. 244-248, 1994.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK, W.C.; RAI, K.S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 6, p. 939-945, 1992.

LANDRY, B.S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Myrmaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**, n. 36, p. 580-587, 1993.

RIBEIRO, P.A.O. **Testes de primers para distinção de gêneros e espécies próximas em termitidae (Isoptera, Insecta) com uso da técnica de RAPD.** 2001. 18p. Monografia (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

RIESEBERG, L. H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology**, n. 5, 99-105, 1996.

ROUT, G. R. Evaluation of genetic relationship in *Typhonium* species through random amplified polymorphic DNA markers. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 127-130, 2006.

SMITH, J. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; LEADBETTER, J. R.; BUSH, G.; ROBERTS, D. L.; FULBRIGHT, D. W. Characterization of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use

of RAPD products in phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 3, p. 135-145, 1994.

WILLIAMS, J. G. K.; HANFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, p. 704-740, 1993.

Tabela I: Relação dos organismos utilizados para análise, com local de coleta, sexo e coloração

Espécie	Coloração	Sexo	Procedência	Data da Coleta
<i>Rhinocricus</i> 1	Escuro	macho	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 2	Escuro	macho	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 3	Claro	fêmea	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 4	Escuro	macho	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 5	Claro	fêmea	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 6	Médio	fêmea	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 7	Médio	fêmea	São Carlos	15-nov-03
<i>Rhinocricus</i> 8	Médio	macho	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 9	Escuro	macho	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 10	Claro	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 11	Escuro	macho	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 12	Claro	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 13	Médio	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 14	Escuro	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 15	Médio	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Rhinocricus</i> 16	Médio	fêmea	São Carlos	19-mar-04
<i>Gymnostreptus olivaceus</i>			Rio Claro	15-abr-04
<i>Gymnostreptus olivaceus</i>			Rio Claro	15-abr-04

Tabela II: Primers utilizados para a análise molecular e suas seqüências

OPM 02	5´ ACAACGCCTC 3´
OPM 05*	GGGAACGTGT
OPM 08*	TCTGTTCCCC
OPV 03	CTCCCTGCAA
OPV 06	ACGCCAGGT
OPV 10*	GGACCTGCTG
OPV 12	ACCCCCACT
OPV 14	AGATCCCGCC
OPV 17	ACCGGCTTGT
OPV 18	TGGTGGCGTT
OPV 19	GGGTGTGCAG
OPV 20	CAGCGTGGTC

* Primers utilizados para a análise deste trabalho.

Tabela III. Primers escolhidos para análise RAPD e o número de fragmentos amplificados

Primers	Tamanho dos fragmentos (Kb)
OPM 05	341, 441, 531, 517, 576, 539, 650, 724, 753, 972, 1237, 1254, 1800
OPM 08	350, 520, 534, 629, 683, 731, 922, 934, 1071, 1445, 1523, 1568, 1633, 2174, 2526
OPV 10	403, 453, 646, 774, 825, 879, 980, 1035, 1359, 1397, 1530, 1675, 1753, 2009, 2365
Total	45

Tabela IV. Matriz de distância (euclidiana) entre os indivíduos do gênero *Rhinocricus* e *Gymnostreptus* obtida na análise dos fragmentos gerados por meio da técnica RAPD.

	R1E	R2E	R3C	R4E	R5C	R6M	R7M	R8M	R9E	R10C	R11E	R12C	R13M	R14E	R15M	R16M	G1	G2
R1E	0,00	2,24	2,45	3,16	3,00	3,32	4,58	3,00	3,46	2,83	3,16	3,46	3,46	3,46	3,16	3,74	5,39	5,74
R2E	2,24	0,00	1,73	2,24	2,83	2,45	4,47	2,00	3,00	2,65	2,65	3,00	3,00	3,00	2,65	3,61	5,29	5,66
R3C	2,45	1,73	0,00	2,83	2,24	2,65	4,58	2,65	3,16	2,45	2,45	3,16	3,16	2,83	2,45	3,16	5,39	5,74
R4E	3,16	2,24	2,83	0,00	2,65	1,73	4,12	1,73	2,83	2,45	2,83	2,83	2,45	2,83	2,45	3,16	5,00	5,20
R5C	3,00	2,83	2,24	2,65	0,00	2,00	4,24	2,83	2,65	1,00	2,65	2,24	2,24	2,65	2,24	2,24	5,29	5,48
R6M	3,32	2,45	2,65	1,73	2,00	0,00	4,00	2,00	2,24	1,73	3,00	2,24	2,24	2,24	2,24	2,65	5,29	5,48
R7M	4,58	4,47	4,58	4,12	4,24	4,00	0,00	4,24	3,61	4,12	4,36	3,61	3,61	4,36	4,36	4,12	4,90	5,29
R8M	3,00	2,00	2,65	1,73	2,83	2,00	4,24	0,00	2,24	2,65	2,65	3,00	3,00	3,00	2,65	3,32	5,10	5,48
R9E	3,46	3,00	3,16	2,83	2,65	2,24	3,61	2,24	0,00	2,45	3,16	2,00	2,00	3,16	2,83	2,45	5,00	5,39
R10C	2,83	2,65	2,45	2,45	1,00	1,73	4,12	2,65	2,45	0,00	2,83	2,00	2,00	2,45	2,00	2,45	5,39	5,57
R11E	3,16	2,65	2,45	2,83	2,65	3,00	4,36	2,65	3,16	2,83	0,00	3,16	3,16	3,16	2,45	2,83	4,80	5,20
R12C	3,46	3,00	3,16	2,83	2,24	2,24	3,61	3,00	2,00	2,00	3,16	0,00	1,41	2,83	2,45	2,45	5,00	5,20
R13M	3,46	3,00	3,16	2,45	2,24	2,24	3,61	3,00	2,00	2,00	3,16	1,41	0,00	3,16	2,45	2,45	5,00	5,20
R14E	3,46	3,00	2,83	2,83	2,65	2,24	4,36	3,00	3,16	2,45	3,16	2,83	3,16	0,00	2,45	2,83	5,39	5,57
R15M	3,16	2,65	2,45	2,45	2,24	2,24	4,36	2,65	2,83	2,00	2,45	2,45	2,45	2,45	0,00	2,45	5,20	5,39
R16M	3,74	3,61	3,16	3,16	2,24	2,65	4,12	3,32	2,45	2,45	2,83	2,45	2,45	2,83	2,45	0,00	5,00	5,20
G1	5,39	5,29	5,39	5,00	5,29	5,29	4,90	5,10	5,00	5,39	4,80	5,00	5,00	5,39	5,20	5,00	0,00	2,00
G2	5,74	5,66	5,74	5,20	5,48	5,48	5,29	5,48	5,39	5,57	5,20	5,20	5,20	5,57	5,39	5,20	2,00	0,00

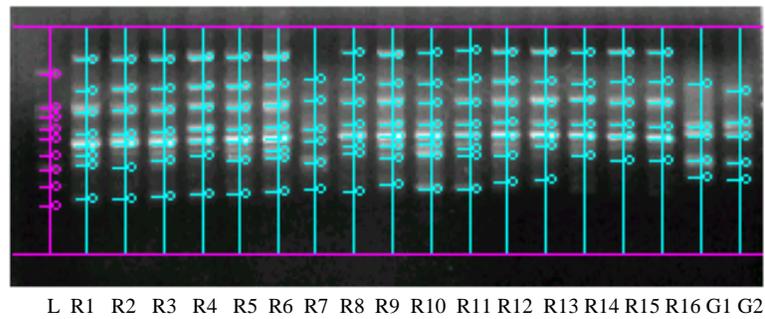


Figura 1. Gel de Agarose analisado pelo programa 1D Image Analysis Software (Kodak) mostrando as bandas polimórficas obtidas pela RAPD. L: Ladder 100bp. Números R1-R16 espécimes do gênero *Rhinocricus* e G1-G2 espécimes do gênero *Gymnostreptus*.

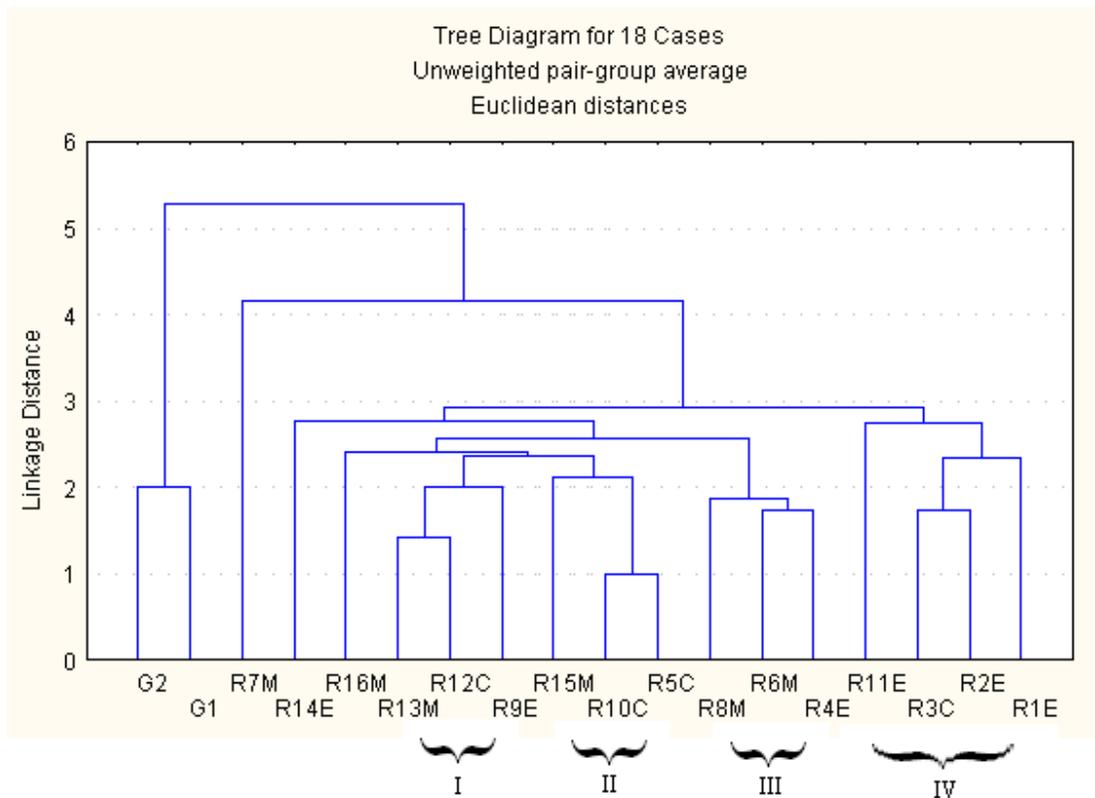


Figura 2. Fenograma indicando as distâncias entre os indivíduos estudados, a partir dos fragmentos de DNA obtidos com os primers OPM 05, OPM08 e OPV 10 (UPGMA). Nos números que representam os espécimes, R se refere a inicial do gênero (*Rhinocricus*), o número está relacionado à coleta e a última letra corresponde à coloração no momento da fixação (clara, média e escura). G1 e G2, referem-se aos espécimes de *Gymnostreptus*, usados como espécimes estranhos (ou externos) em relação aos espécimes estudados. As chaves representam os agrupamentos verificados na análise.

Capítulo 4

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DO GÊNERO
Rhinocricus Karsch, 1881 (Diplopoda: Rhinocricidae)

Calligaris, I. B.¹, Fontanetti, C.S.¹

1- Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP- Rio Claro/ São Paulo

Autor correspondente: Izabela Braggião Calligaris, Avenida 24A, 1515, Rio Claro/ São Paulo- Brasil. CEP: 13506-900. Telefone (19) 3526-4135

Resumo

Foi realizado um estudo citogenético em espécies simpátricas do gênero *Rhinocricus*, que possuem grande similaridade em seus caracteres morfológicos, mas que quando juntas, apresentam um gradiente de coloração que varia do marrom escuro ao bege claro. Estabeleceu-se então, três padrões de coloração no grupo estudado, denominados como escuros, médios e claros. O número diplóide encontrado para os três foi o mesmo, $2n=20$. O complemento cromossômico é constituído por dois pares de cromossomos grandes, três médios e cinco pequenos, sendo a morfologia de difícil definição. O padrão de bandamento C apresentou na maioria dos cromossomos, marcação nas regiões pericentroméricas, em todos os padrões de coloração. A AgRON evidenciou marcação na região intersticial de um par de cromossomos grandes, possivelmente o par dois.

Palavras-chave: milipede, bandamento, citogenética, espécies crípticas.

Introdução

As espécies de Diplopoda constituem um interessante material para o estudo citogenético, principalmente devido à escassez de dados e falta de informação a respeito da distribuição de heterocromatina, DNA satélite e organização nucleolar (HOPKIN; READ, 1992).

Em espécies brasileiras, Fontanetti e colaboradores têm se dedicado a catalogar o número cromossômico e o sistema de determinação do sexo em diplópodos, totalizando até o momento 16 espécies estudadas (FONTANETTI, 1990; 1991; 1996a; b; c; 1998; 2000; FONTANETTI et al., 2002; 2003; CAMPOS; FONTANETTI, 2004; 2005; SOUZA et al., 2005), número bastante reduzido se comparado com o número estimado de 2000 a 3000 espécies para o Brasil.

A maioria das informações sobre cromossomos de diplópodos é baseada em análises feitas com coloração convencional. O emprego de técnicas citogenéticas com coloração diferencial em cromossomos de diplópodos é raro, principalmente devido às dificuldades técnicas na obtenção de cromossomos mitóticos.

A ordem Spirobolida tem sua distribuição e diversificação preferencialmente na região tropical, com poucas famílias representadas em regiões temperadas (HOFFMAN et al., 1996). Nesta ordem, o gênero *Rhinocricus* se compõe de organismos muito semelhantes em seus caracteres morfológicos, mesmo em relação aos gonopódios, o que dificulta a identificação das espécies.

Rhinocricus varians Broelemann, 1901, é caracterizada por apresentar coloração bruno-denegrado, com tonalidade de violáceo, com metazonitos mais claros, antenas pardas com os últimos artículos mais claros, amarelados, e média de comprimento de 73.5mm. *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938, é facilmente reconhecida quando viva, pela cor castanho-rosa a acajú, telson denegrado e pernas e antenas flavo-esbranquiçadas, com média de comprimento de 64.1mm (SCHUBART, 1951). As duas espécies quando juntas, apresentam um gradiente

de coloração que vai do marrom escuro ao bege claro, mas com outros caracteres morfológicos muito semelhantes, incluindo a configuração de seus gonopódios.

Diante da observação de vários indivíduos do exemplo acima citado, duas hipóteses foram levantadas: existem duas espécies no grupo, realmente distintas, apresentando uma delas um polimorfismo quanto ao caráter coloração. Ou o grupo é composto apenas por uma espécie válida, altamente polimórfica. Para investigar esta questão, os indivíduos desse gênero foram então estudados citogeneticamente.

Neste contexto, Fontanetti (1996c) utilizou o número cromossômico para validar uma espécie de *Pseudonannolene*, *P. silvestris* ($2n=16$), cuja validade foi colocada em dúvida, devido à sua semelhança com *P. tricolor* ($2n=14$).

O objetivo deste trabalho foi verificar se existem diferenças citogenéticas em um grupo de indivíduos do gênero *Rhinocricus*, coletados no mesmo habitat e que apresentam o gradiente de coloração acima citado.

Material e métodos

Os indivíduos do gênero *Rhinocricus* foram coletados no Campus da UNESP/ Rio Claro, por Izabela B. Calligaris, no período de novembro de 2005 a janeiro de 2006, num total de 18 indivíduos, sendo 14 machos e 4 fêmeas. Esses organismos foram separados de acordo com a coloração, classificada como clara, média e escura.

Os espécimens coletados foram submetidos ao jejum por uma semana e em seguida foram injetados com colchicina 0,08%. Após 16 horas (overnight), os espécimens foram dissecados e as gônadas e o intestino médio retirados, hipotonizados em água de torneira por 5 e 15 minutos, respectivamente, e em seguida fixados em Carnoy I (3 partes de metanol e uma de ácido acético glacial). Alguns machos não receberam a aplicação de colchicina para obtenção dos cromossomos meióticos.

As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento e coradas com Giemsa 3%.

O bandamento C foi realizado segundo Sumner (1972), e a impregnação das regiões organizadoras do nucléolo, segundo Howell; Black (1980).

Resultados

O número diplóide encontrado em todos os indivíduos da amostra analisada foi $2n=20$, não sendo observado nenhum par heteromórfico entre os elementos do complemento que indicassem o tipo de mecanismo de determinação sexual (Figuras 1-3).

O complemento é constituído por dois pares de cromossomos grandes (pares 1 e 2), três pares médios e cinco pares pequenos (Figura 3). A morfologia dos cromossomos é de difícil definição.

O bandamento C demonstrou a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos (Figura 4 e 5), nos representantes das três colorações, sem nenhuma diferença observada entre elas; em alguns cromossomos a marcação C+ é bem evidente na região pericentromérica, mas em outros, além da marcação nesta região, observa-se uma colocação intermediária ao longo do cromossomo, inclusive na região telomérica. Alguns pares parecem quase totalmente corados pela técnica (setas na Figura 4).

A impregnação pelo íon prata evidenciou a presença de RONS na região intersticial de um par de cromossomos grandes, possivelmente o par dois (setas nas Figuras 6 e 7). Na maioria dos núcleos observados, a RON foi melhor evidenciada em um dos cromossomos (Figura 6).

Discussão

O gênero *Rhinocricus* é pouco estudado citogeneticamente, sendo conhecido o número cromossômico de três espécies: *Rhinocricus padbergi*, $2n=20$, *Rhinocricus cachoeirensis*, $2n= 24$ e *Rhinocricus* sp, $2n= 28$ (FONTANETTI et al., 2002).

O número diplóide encontrado para o grupo aqui estudado ($2n= 20$), ocorre também em *Glomeris annulata* (BESSIÈRE, 1948), *Ktenostreptus* sp. (CHOWDAIAH, 1966), *K. costulatus* (CHOWDAIAH; KANAKA, 1979), nenhuma delas pertencente à ordem Spirobolida.

Para representantes da fauna brasileira, este número foi reportado para *Pseudonannolene tocaiensis* (FONTANETTI, 1996c) e *Rhinocricus padbergi* (FONTANETTI et al., 2002). Segundo a literatura, o grupo aqui analisado como claro, representaria a espécie *R. padbergi* e o escuro *R. varians*. Assim, se a espécie *R. varians* for válida, o número cromossômico desta é igual ao de *R. padbergi*. Para a ordem Spirobolida, são relatados estudos nas famílias Rhinocricidae e Pachybolidae, com número cromossômico variando de $2n=12$ a $2n=26$, sendo em ambas, citado o sistema de determinação do sexo do tipo XY; porém este não foi identificado na espécie *R. padbergi* (FONTANETTI et al., 2002) e agora nem em *R. varians*.

Achar (1983) comenta que o mecanismo de determinação do sexo nos Diplopoda está num estado primitivo, pois na maioria das espécies, os cromossomos sexuais são pouco diferenciados dos autossomos e, mesmo entre X e Y, a semelhança é muito grande. Esta observação concorda com os estudos de cromossomos de uma variedade de mamíferos placentários em que X e Y têm evoluído de um par de autossomos sem se diferenciarem morfológicamente. Em *Rhinocricus* não foi possível detectar o par sexual, pela falta de heteromorfismo destes cromossomos no complemento, concordando com o observado em boa

parte dos estudos realizados em diplópodos (FONTANETTI et al., 2002; TANABE, 1992).

A maioria dos estudos citogenéticos realizados com diplópodos utiliza apenas a coloração convencional, portanto, os dados obtidos neste trabalho, utilizando a coloração diferencial são relevantes e podem auxiliar estudos futuros com o gênero.

Os poucos estudos realizados até o momento com bandamento C revelaram uma alta porcentagem de heterocromatina constitutiva no genoma deste grupo, tanto em espécies da fauna brasileira (CAMPOS; FONTANETTI, 2004; SOUZA et al., 2005) como de outras regiões (VITTURI et al., 1997; 2001). Neste caso, o total de heterocromatina constitutiva representa entre 50 a 67% do genoma.

O padrão de bandamento C pericentromérico observado neste estudo, foi detectado também em duas espécies de diplópodos da fauna brasileira, do gênero *Pseudonannolene* (Spirostreptidae) (SOUZA et al., 2002; PRADO; FONTANETTI, 2000) e em *Carlogonus acifer* (Harpegophoridae), uma espécie asiática (ACHAR; CHOWDAIAH, 1980).

Semelhante ao observado aqui em alguns pares de cromossomos, King; John (1980) comentaram a existência de segmentos C+ acinzentados nos cromossomos de gafanhotos e King (1980); King et al. (1990) observaram o mesmo, na região telomérica dos cromossomos de anfíbios da família Hylidae. Os autores discutem a existência de diferenças intracromossômicas na heterocromatina destas espécies, indicando locais particulares, com perfis de DNA muito específicos (KING, 1991; JOHN et al., 1986). Esta questão deverá ser melhor investigada no grupo aqui estudado. Prado; Fontanetti (2000) observaram RONS puntiformes em *Pseudonannolene silvestris* por meio da técnica de FISH, não detectadas por AgRON.

Os estudos de regiões organizadoras de nucléolos são ainda mais raros. Vitturi et al. (2001) observou que em *Enologus oxypygum*, 17% do total do DNA consiste de cistrons ribossômicos, detectados por sondas rDNA pela técnica de

FISH. Os autores detectaram também, que somente pequenas porções FISH+ são prata-positivas, sugerindo que o rDNA seja apenas parcialmente ativo na transcrição; o mesmo foi observado aqui nos espécimens utilizados, em que a maioria dos núcleos apresentou somente um dos cromossomos do par marcado pela prata.

Podemos concluir que não existem diferenças citogenéticas quando comparamos os indivíduos das três colorações; isto porém, não significa que se trata de uma mesma espécie, uma vez que, freqüentemente, se observa gêneros inteiros de diferentes grupos, homogêneos quanto a constituição cariotípica, mas podemos inferir que, muito provavelmente, o parentesco entre os indivíduos estudados é muito próximo.

Agradecimentos: À Rogilene Ap. Prado pela colaboração na montagem das lâminas e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Referências

ACHAR, K. P. Karyological studies in nine species of Indian Diplopoda (Myriapoda). **Nucleus**, Calcuta, v. 26, n. 3, p. 191-197, 1983.

ACHAR, K. P.; CHOWDAIAH, B. N. The use of C-banding technique in the chromosome studies of a millipede espécie *Carlogonus acifer*. **Caryologia**, Firenze, v. 33, n. 2, p. 185-191, 1980.

BESSIÈRE, C. La spermatogènese de quelques Myriapods diplopods. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, Paris, v. 85, n. 3, p. 149-236, 1948.

CAMPOS, K. A.; FONTANETTI, C. S. Chromosomal characterization of *Pseudonannolene strinatii* (Spirostreptida, Pseudonannolenidae). **Iheringia**, Porto Alegre, v. 94, n. 1, p. 53-56, 2004.

CAMPOS, K. A.; FONTANETTI, C. S. Composition of constitutive heterochromatin of *Pseudonannolene strinatii* Mauriès, 1974 (Diplopoda, spirostreptidae) analyzed by AT/CG specific fluorochromes. **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 4, p. 765-770, 2005.

CHOWDAIAH, B. N. Cytological studies of some Indian Diplopoda (Myriapoda). **Cytologia**, Tokyo, v. 31, n. 3, p. 294-301, 1966.

CHOWDAIAH, B. N.; KANAKA, R. Chromosome cytology of seven species of Indian Diplopoda (Myriapoda). In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres: Academic Press, p. 9-20, 1979.

FONTANETTI, C. S. Meiotic prophase in Diplopoda. **Revta. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 697-703, 1990.

FONTANETTI, C. S. Karyotypes of some Brazilian Diplopods. **Revta. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 697-703, 1991.

FONTANETTI, C. S. The use of cytogenetics to certify a Diplopoda species (Pseudonannolenida, Pseudonannolenidae). **Revta. Bras. de Biol.**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 775-781, 1996a.

FONTANETTI, C. S. Description of a new species and the karyotype of the cavernicolous millipede *Pseudonannolene* Silvestri and the karyotype of *Pseudonannolene strinatii* Mauriès (Diplopoda, Pseudonannolenida,

Pseudonannolenidae). **Rev. Bras. Zool.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 419-426, 1996b.

FONTANETTI, C. S. Karyotype of a termitophilic species of Diplopoda (Polydesmida, Chelodesmidae). **Brazilian Jour. of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 593-595, 1996c.

FONTANETTI, C. S. Chromosome numbers of some brazilian species of diplopods (Diplopoda, Arthropoda). **Cytologia**, Tokio, v. 63, p. 149-159, 1998.

FONTANETTI, C. S. Description and chromosome number of a species of *Pseudonannolene silvestri* (Arthropoda, Diplopoda, Pseudonannolenidae). **Revta. Bras. Zool.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 187-191, 2000.

FONTANETTI, C. S.; CAMPOS, K.; PRADO, R. A.; SOUZA, T. S. Cytogenetic Studies in Diplopoda. **Cytologia**, Tokio, v. 67, p. 253-260, 2002.

FONTANETTI, C. S.; UDULUTSCH, R.; PIETROBON, T. A new species of cave millipede of the genus *Pseudonannolene* (Diplopoda): description and karyotype. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 65-68, 2003.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. Oxford University Press, 233p., 1992.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Practical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). **Amazoniana**, v. 14, p. 1-35, 1996.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1016, 1980.

JOHN, B.; KING, M.; CONTRERAS, N. population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. 2. Molecular characterization of the distal C-band polymorphism. **Chromosoma**, Berlin, v. 94, n. 1, p. 45-58, 1986.

KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma**, Berlin, v. 80, n. 2, p. 191-217, 1980.

KING, M. The evolution of heterochromatin in the amphibian genome. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Londres: Academic Press, 1991, p. 359-391.

KING, M. CONTRERAS, N.; HONEYCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) show by 18S+28S in situ hybridization. **Genetica**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 17-29, 1990.

KING, M.; JOHN, B. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma**, Berlin, v. 76, n. 2, p. 123-150, 1980.

PRADO, R. A.; FONTANETTI, C.S. Citogenética de *Pseudonannolene silvestris* (Diplopoda, Pseudonannolenidae): bandamento C, AgNOR e FISH com sonda de rDNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n.3, p.4, 2000.

SCHUBART, O. Contribuição para a Fauna do Estado de São Paulo II. Os Rhinocricidae (Opisthospermophora, Diplopoda). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 23, n.2, p. 221-275, 1951.

SOUZA, T. S.; KASAHARA, S.; FONTANETTI, C. S. Caracterização cromossômica de uma nova espécie de *Pseudonannolene* (Diplopoda: Pseudonannolenida). **48^o Congresso Nacional de Genética, Resumo CD**, Águas de Lindóia, 2002.

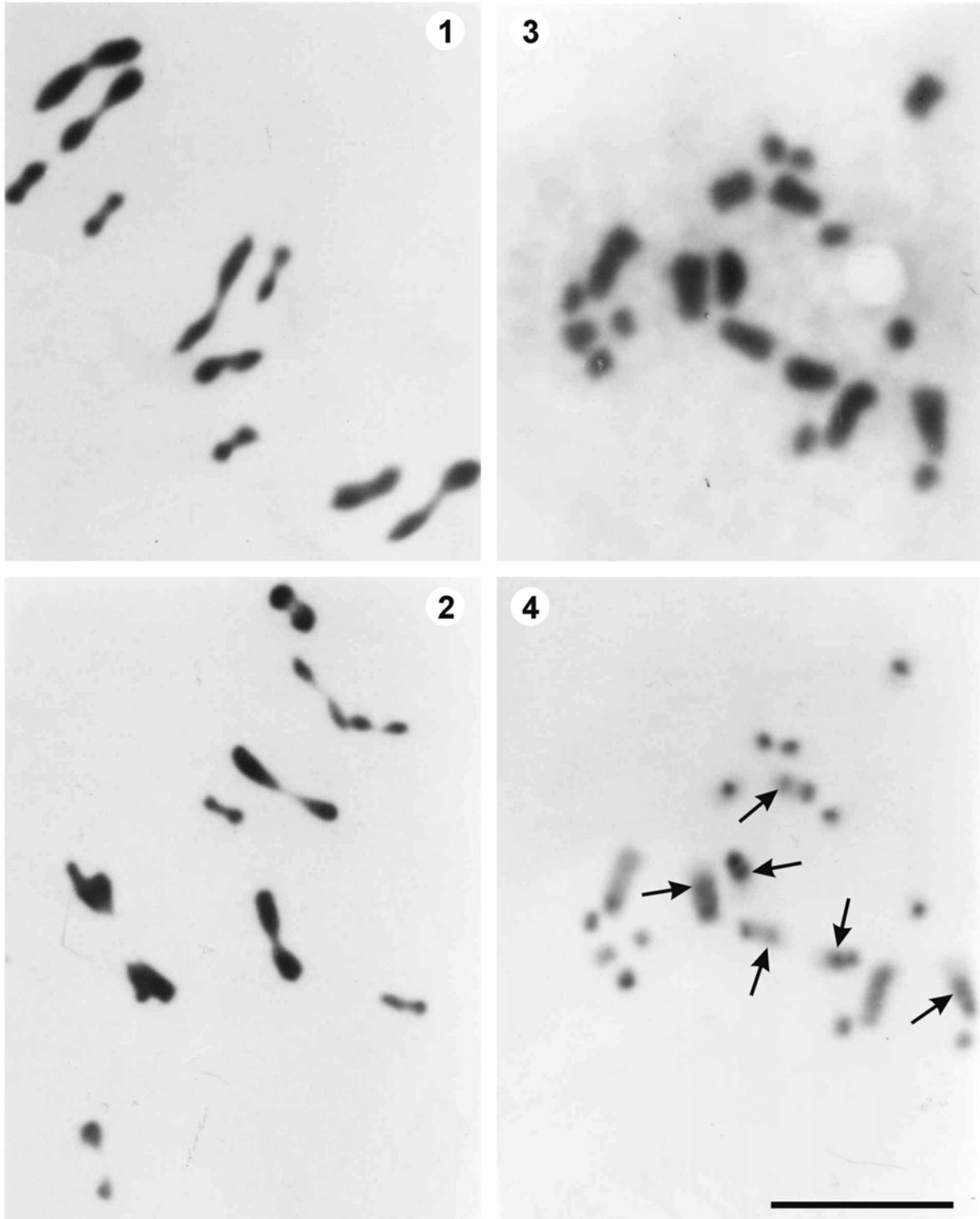
SOUZA, T. S.; PRADO, R. A.; FONTANETTI, C. S. High content of constitutive heterochromatin in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda). **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 1, p. 47-51, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TANABE, T. Karyotypes of four Xystodesmid millipedes from Japan. **Acta Arachnologica**, Osaka, v. 41, n. 1, p. 87-90, 1992.

VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; CAPUTO, V.; SPARACIO, I.; BARBIERI, R. High heterochromatin content in somatic chromosomes of two unrelated species of Diplopoda (Myriapoda). **Chromosome Res.**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 407-412, 1997.

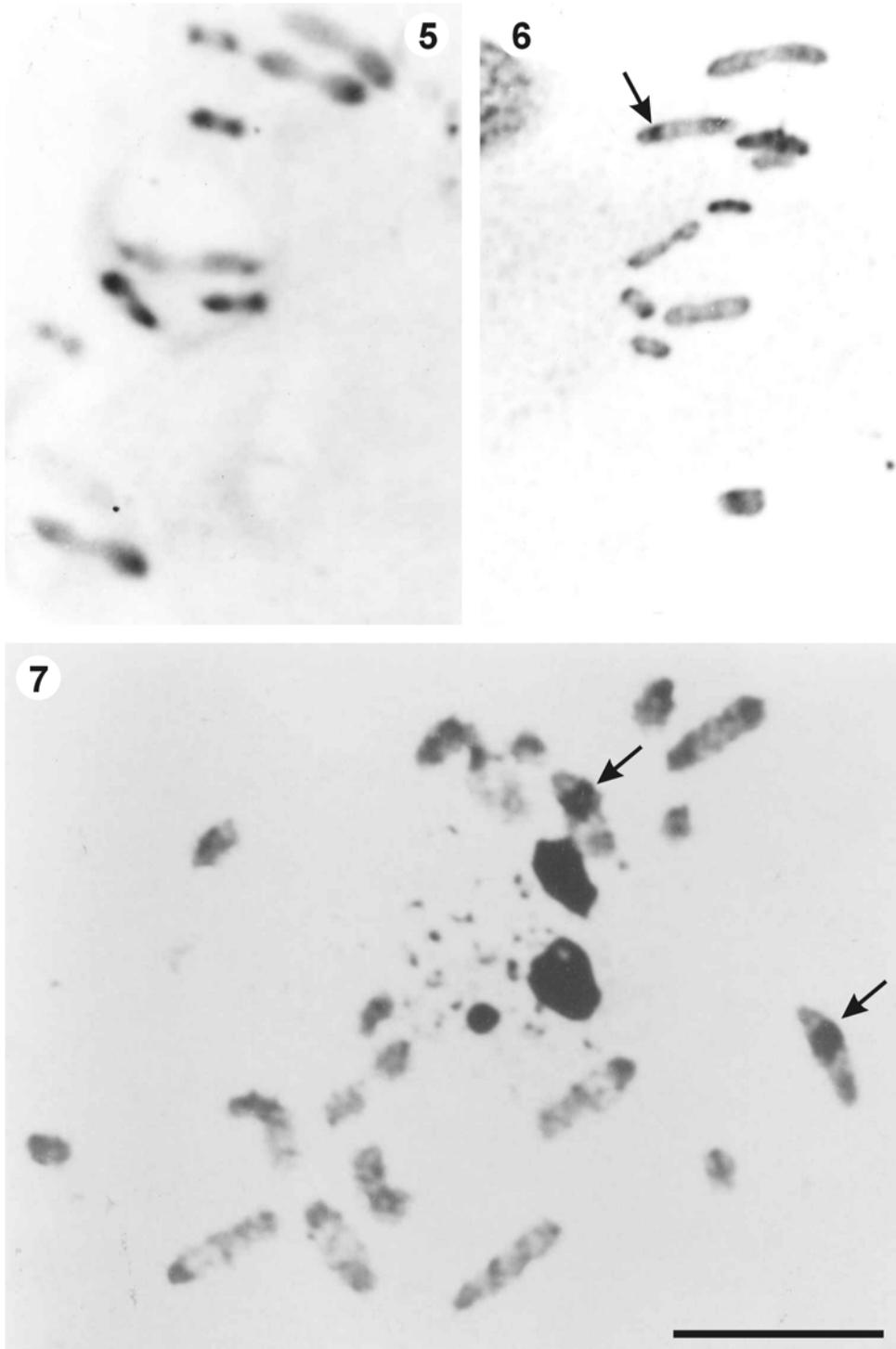
VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; MANDRIOLI, M.; PIRRONE, A.M.; GRISPO, G.; BARBIERI, R. 18S- 28S rDNA is interspersed throughout heterochromatin in the millipede *Enologus oxypygum* (Diplopoda). **Genetica**, Dordrecht, v.110, n. 2, p. 151-155, 2001.



Figuras 1, 2. Metáfases I de espécimens de *Rhinocricus* de coloração média (1) e clara (2); **3, 4.** Cromossomos mitóticos de espécimens de *Rhinocricus* de coloração escura corados com Giemsa (3) e submetidos ao bandamento C (4).

Setas em 4= cromossomos com marcação C+ fora da região pericentromérica.

Escala= 10 μ m.



Figuras 5. Metáfase I vista em 1 submetida ao bandamento C; **6.** Metáfase I de um espécimen de *Rhinocricus* de coloração média submetida à técnica de AgRON; **7.** Cromossomos mitóticos de um espécimen escuro submetidos à técnica de AgRON

Setas= RONS

Escala= 10µm.

Considerações finais

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diplópodos pertencem a um grupo pouco estudado em vários aspectos, resultando em pouco conhecimento a respeito de sua biologia, comportamento, etc.

Na família Rhinocricidae, os indivíduos apresentam caracteres muito semelhantes, incluindo a configuração de seus gonopódios, estrutura utilizada como caráter taxonômico, dificultando a identificação das espécies. O grupo estudado durante a elaboração desta tese não foge à regra. São organismos que apresentam grande similaridade, porém com um gradiente de coloração, o qual gerou dúvidas quanto à validação de duas espécies. Na literatura, encontra-se a descrição dessas espécies como *Rhinocricus varians* e *R. padbergi*.

Rhinocricus varians é descrito por possuir coloração bruno-denegrada e a medida média do comprimento dos espécimes estudados é de 73,5mm. *R. padbergi* é descrito por apresentar coloração castanho-rosa a acajú e comprimento médio de 64,1mm. Devido à ocorrência do gradiente, poderia

ocorrer somente uma espécie, altamente polimórfica quanto ao caráter coloração. Na tentativa de entender melhor este grupo foram utilizadas várias ferramentas, que geraram resultados um pouco contrastantes, indicando que este grupo merece maior atenção, uma vez que poucos são os trabalhos encontrados sobre os Rhinocricidae.

A análise morfométrica pode ser utilizada para distinguir espécies, gêneros e dimorfismo em vários grupos animais. Chaud-Neto (1975) utilizou a análise da Distância Generalizada de Mahalanobis (D^2) para verificar diferenças nos caracteres morfológicos entre machos diplóides, operárias diplóides, machos haplóides e operárias triplóides, correlacionando-as com o balanço genético, responsável pela determinação sexual em *Apis mellifera*.

Peruquetti (2002) estudou o dimorfismo entre machos de *Euglossa mandibularis* para verificar diferenças entre indivíduos que apresentavam tufo escutelar daqueles que não possuíam. Utilizando o teste de Hotelling foi observada diferença significativa entre os organismos. Os resultados demonstraram que as estruturas que influenciaram na diferença entre os indivíduos claros, médios e escuros foram o comprimento e o diâmetro do corpo e o comprimento do telson. Quando utilizada a distância generalizada de Mahalanobis observamos que os indivíduos escuros apresentaram distância maior em relação aos claros (2,55) do que aos médios (1,82); a distância dos médios em relação aos claros, por sua vez, foi bem menor (0,86), valores este relativos aos machos. Nas fêmeas os valores são um pouco diferentes, mas a correlação permanece. Concluiu-se então que os indivíduos escuros pertencem a *R. varians* e os médios e claros a *R. padbergi*, apresentando esta última espécie um alto polimorfismo quanto ao caráter coloração.

O estudo das antenas demonstrou similaridade nos resultados obtidos na análise morfométrica, apresentando também aqui diferença estatística entre os indivíduos escuros e claros. Os indivíduos médios não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos outros dois grupos, permanecendo numa posição intermediária, em relação ao número médio de cones que apresentaram. Os

resultados obtidos neste trabalho não concordaram com a citação de Schubart (1951) em que o autor afirma que o número de cones é constante para cada espécie. Foi observada variação no número de cones em todas as colorações. Portanto, no presente estudo, a correlação número de cones X espécie não pode ser utilizada. Fontanetti; Camargo-Mathias (2004) observaram variação para a espécie *R. padbergi*, corroborando o resultado obtido no presente estudo.

Estudos com outras espécies do gênero se mostram necessários para verificar se esta variação também pode ser observada, ou mesmo a utilização de diferentes estímulos possa auxiliar, demonstrando talvez, que esta variação ocorra por influência do ambiente.

A técnica RAPD é utilizada para distinguir espécies, organismos da mesma espécie mas de localidades geográficas diferentes, além de polimorfismos do DNA. Rout (2006) estudou três espécies de *Triphonium* (Araceae), *T. trilobatum*, *T. roxbrughii* e *T. flagelliforme* e a análise demonstrou que as duas primeiras espécies apresentam uma similaridade de 63%, e a terceira, *T. flagelliforme*, similaridade de 43% em relação às duas anteriores. O autor comenta que a técnica de RAPD poderia diferenciar todas as espécies de *Triphonium*, pela análise das bandas que demonstram similaridades.

Os resultados com RAPD não separaram os indivíduos quanto à coloração que apresentavam, colocando como espécies próximas indivíduos claros e escuros. O resultado apresentou novas questões a serem investigadas, uma vez que houve no mínimo quatro grupamentos diferentes, e também três indivíduos com pouca similaridade com estes grupos, ficando isolados dos mesmos. O que chamou mais a atenção foi o organismo identificado como R7, de coloração média, que apresentou maior distância entre todos os outros. O grupo estudado apresentou grande variabilidade genética, e o caráter coloração não se demonstrou confiável para identificação das espécies, pois a correlação de tamanho/coloração obtida no teste de morfometria não se confirmou. Os organismos do grupo externo, dois representantes de *Gymnostreptus olivaceus*,

por sua vez, formaram um grupamento a parte, demonstrando coerência dos resultados, indicando que a técnica foi realizada de forma correta.

Alguns estudos empregando a técnica de RAPD são utilizados para verificar diferenças entre organismos da mesma espécie mas de regiões geográficas diferentes, não sendo o caso no presente estudo, uma vez que os organismos foram coletados no mesmo habitat, diferindo apenas na época de coleta (novembro e março), mas fica difícil inferir se diferenças ambientais poderiam atuar nos organismos de modo a influenciar os resultados da técnica empregada. Pelo resultado, maiores estudos devem ser efetuados na tentativa de entender quais fatores influenciaram esses grupamentos.

Uma possível explicação para o grupamento de colorações diferentes seria a ocorrência de intercruzamentos entre as duas espécies, mas a confirmação desta hipótese requer um extenso trabalho sobre a biologia reprodutiva, o que para o grupo é muito difícil devido ao habitat que ocupam. A técnica porém, confirma os dados das análises morfométricas, no sentido de esclarecer a presença de mais de uma espécie no grupo analisado. O grupamento de indivíduos de diferentes colorações, obtido na análise molecular, demonstra grande similaridade genética desses organismos, resultado de um possível intercruzamento entre as espécies *R. padbergi* e *R. varians*.

Os estudos citogenéticos apresentaram resultados contrastantes com todos os anteriores, por apresentarem similaridade para todas as colorações estudadas. O número cromossômico foi o mesmo para todas as colorações ($2n=20$) e padrões de bandamento C e impregnação pelo íon prata também se demonstraram idênticos. Este foi o primeiro trabalho utilizando técnicas de coloração diferencial para indivíduos do gênero *Rhinocricus* e os resultados podem auxiliar futuros trabalhos com o gênero.

Diante do exposto conclui-se que as duas espécies do gênero devem ser mantidas, apesar do resultado obtido na análise citogenética. O número diplóide $2n=20$, observado para os três padrões de coloração, não indica necessariamente, a presença de uma única espécie, sendo conhecidos gêneros em que o número

cromossômico observado é o mesmo para a maioria das espécies (CHOWDAIAH; KANAKA, 1974; ACHAR, 1986; 1987; 1983b; SHARMA; HANDA, 1974).

Literatura citada

VI. LITERATURA CITADA

ACHAR, K. P. The use of G-banding technique in the chromosome studies of a millipede species – *Spirostreptus asthenes*. **Current Science**, Bangalore v. 52, n. 11, p. 540-543, 1983a.

ACHAR, K. P. Karyological studies in nine species of Indian Diplopoda (Myriapoda). **Nucleus**, Calcuta, v. 26, n. 3, p. 191-197, 1983b.

ACHAR, K. P. Analysis of male meiosis in five species of Indian Diplopoda (Myriapoda). **Caryologia**, Firenze, v. 37, n. 4, p. 373-386, 1984a.

ACHAR, K. P. Chromosome studies in Indian Diplopoda (Myriapoda). I. A note on the occurrence of polyploidy in *Polydesmus gracilis*. **Current Science**, Bangalore, v. 53, n. 14, p. 764-767, 1984b.

ACHAR, K. P. Chromosome studies in Indian Diplopoda (Myriapoda). II. A note on the occurrence of translocation in *Aulacobolus excellens*. **Current Science**, Bangalore, v. 54, n. 20, p. 1057-1060, 1985.

ACHAR, K. P. Analysis of male meiosis in seven species of Indian pill-millipedes (Diplopoda: Myriapoda). **Caryologia**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 89-101, 1986.

ACHAR, K. P. Chromosomal evolution in Diplopoda (Myriapoda: Arthropoda). **Caryologia**, Firenze, v. 40, n. 1-2, p. 145-155, 1987.

ACHAR, K. P.; CHOWDAIAH, B. N. The use of air drying in the study of diplopod chromosomes. In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres: Academic Press, 1979, p. 21-23.

ACHAR, K. P.; CHOWDAIAH, B. N. The use of C-banding technique in the chromosome studies of a millipede espécie *Carlogonus acifer*. **Caryologia**, Firenze, v. 33, n. 2, p. 185-191, 1980.

ADIS, J. Illustrated key for neotropical Myriapoda (Arthropoda). **Amazoniana**, 10 (4): 353-360, 1989

BAKER, G.H. Parasites of the milipede *Ommatoiulus moreletii* (Lucas) (Diplopoda:lulidae) in Portugal, and their potential as biological control agents in Austrália. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v. 33, p. 23-32, 1985.

BARRACLOUGH, R. & BLACKITH, R.W.. Morphometric relationships in the genus *Ditylenchus*. **Nematologica**, 8: 864-865,1962

BERNINI-Jr. C. **Análise citogenética e diferenciação cromossômica em espécies do gênero *Brachiaría* Grisebach**. Dissertação (Mestre em Genética e

Melhoramento) Londrina-PR. 1997. Universidade Estadual de Londrina-PR. 97p., 1997.

BESSIÈRE, C. La spermatogénese de quelques Myriapods diplopods. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, Paris, v. 85, n. 3, p. 149-236, 1948.

BLACK, W.C. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1993.

BRÖLEMANN, H. W. Myriapodes du Musée de São Paulo. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, v. 5, p. 35-237, 1901.

BRÖLEMANN, H. W. Essai d'un Catalogue dès Myriapodes du Brésil. **Catálogos da Fauna Brasileira**, Museu Paulista, São Paulo, v. 2, 87p., 1909.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes: a new case noticed in the district of Patrocínio, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Advanced Zoology**, Gorakhpur, v. 18, p. 62-63, 1997.

BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C. H. S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Environment**, Washington, v. 2, n. 2, p. 200-223, 2002.

CALLE L., D.A. et al. Morphometric discrimination of females of five species of anopheles of the subgenus Nyssorhynchus from southern and northwest Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 97(8): 1191-1195, 2002.

CALLIGARIS, I.B.; BOCCARDO, L.; SANCHES, M.R.; FONTANETTI, C.S. Morphometric analysis of a population of diplopos of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881. *Folia Biologia (Praha)*, 51, 40-46, 2005.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. & MICÓ- BALAGUER, E.(1998) Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae) **Cytobios**, 94: 169-184.

CAMPOS, K. A.; FONTANETTI, C. S. Chromosomal characterization of *Pseudonannolene strinatii* (Spirostreptida, Pseudonannolenidae). **Iheringia**, Porto Alegre, v. 94, n. 1, p. 53-56, 2004.

CAMPOS, K. A.; FONTANETTI, C. S. composition of constitutive heterochromatin of *Pseudonannolene strinatii* Mauriès, 1974 (Diplopoda, spirostreptidae) analyzed by AT/CG specific fluorochromes. **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 4, p. 765-770, 2005.

CAREY, C.J.; BULL, C.M. Recognition of mates in the Portuguese millipede, *Ommatoiulus moreletti*. **Aust. J. Zool.**, Victoria, v. 34, p. 837-842, 1986.

CARTER, M.C.A. et al Genetic relatedness of north american populations of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 6, p. 1345-53, 1996.

CHAUD-NETTO, J. **Diploid males of *Apis mellifera*- bionomy and contribution of the question of sex determination.** Thesis for the Genetic and Mathematical Departament of Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto USP/ SP, p. 140, 1973.

CHAUD-NETO, J. Sex determination in bees. II. Additivity of maleness genes in *Apis mellifera*. **Genetics**, v. 79, p. 213-217, 1975.

CHOWDAIAH, B. N. Cytological investigations on some Indian Diplopoda (Myriapoda). **Nature**, London, v. 210, n. 5038, p. 847, 1966a.

CHOWDAIAH, B. N. Cytological studies of some Indian Diplopoda (Myriapoda). **Cytologia**, Tokyo, v. 31, n. 3, p. 294-301, 1966b.

CHOWDAIAH, B. N. Chromosome studies in two species of pill millipedes. **Caryologia**, Firenze, v. 19, n. 2, p. 135-141. 1966c.

CHOWDAIAH, B. N. A note on the abnormal sex chromosome behaviour in the male of *Thyropygous* species. **Current Science**, Bangalore, v. 36, n. 4, p. 105-106, 1967.

CHOWDAIAH, B. N. A note on the occurrence of chromatid bridges in the male of *Arthrosphaera* sp. A pill-millipede. **Current Science**, Bangalore, v. 38, n. 7, p. 169-170, 1969.

CHOWDAIAH, B. N.; KANAKA, R. Cytological studies of Indian Diplopoda. II. (Myriapoda). **Bull. Mus. Nat. D'His. Natur.**, Genève, v. 41, n. 2, p. 43-47, 1969. Supplement.

CHOWDAIAH, B. N.; KANAKA, R. Cytological studies in six species of pill-millipedes (Diplopoda-Myriapoda). **Caryologia**, Firenze, v. 27, n.1, p. 55-64, 1974.

CHOWDAIAH, B. N.; KANAKA, R. Chromosome cytology of seven species of Indian Diplopoda (Myriapoda). In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres: Academic Press, 1979, p. 9-20.

CLOUDSLEY- THOMSON, J. L. On the responses to environmental stimuli and the sensory physiology of millipedes (Diplopoda). **Proc. Zool., Soc.** London, v. 121, p. 253-277, 1951.

ENGHOFF, H. The Size of a Millipede. **Berichte des Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins Innsbruck**, n. 10, p. 47-56, 1992.

FONTANETTI, C. S. Moulting behaviour in Chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). **Revta. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 1053-1055, 1989.

FONTANETTI, C. S. Meiotic prophase in Diplopoda. **Revta. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 697-703, 1990.

FONTANETTI, C. S. Karyotypes of some Brazilian Diplopods. **Revta. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 697-703, 1991.

FONTANETTI, C. S. The use of cytogenetics to certify a Diplopoda species (Pseudonannolenida, Pseudonannolenidae). **Revta. Bras. de Biol.**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 775-781, 1996a.

FONTANETTI, C. S. Description of a new species and the karyotype of the cavernicolous millipede *Pseudonannolene silvestri* and the karyotype of *Pseudonannolene strinatii* Mauriès (Diplopoda, Pseudonannolenida, Pseudonannolenidae). **Rev. Bras. Zool.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 419-426, 1996b.

FONTANETTI, C. S. Karyotype of a termitophilic species of Diplopoda (Polydesmida, Chelodesmidae). **Brazilian Jour. Of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 593-595, 1996c.

FONTANETTI, C. S. Chromosome numbers of some brazilian species of diplopods (Diplopoda, Arthropoda). **Cytologia**, Tokio, v. 63, p. 149-159, 1998.

FONTANETTI, C. S. Description and chromosome number of a species of *Pseudonannolene silvestri* (Arthropoda, Diplopoda, Pseudonannolenidae). **Revta. Bras. Zool.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 187-191, 2000.

FONTANETTI, C. S. & CAMARGO-MATHIAS, M.I. (2004) External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda, Spirobolida). **Braz. J. Morphol. Sci.**, 21(2), 73-79.

FONTANETTI, C. S.; CAMPOS, K.; PRADO, R. A.; SOUZA, T. S. Cytogenetic Studies in Diplopoda. **Cytologia**,Tóquio, v. 67,p. 253-260, 2002.

FONTANETTI, C. S.; UDULUTSCH, R.; PIETROBON, T. A new species of cave millipede of the genus *Pseudonannolene* (Diplopoda): description and karyotype. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 65-68, 2003.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda, Spirobolida). **Braz. J. Morphol. Sci.**, 21 (2), 73-79, 2004.

FONTANETTI, C.S. & STAURENGO DA CUNHA, M.A. Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Rev. Bras. Biol.**, 53 (1): 7-12, 1993.

FORTUNER, R., MAGGENTI, A. R. A statistical approach to the objective differentiation of *Hirschmanniella oryzae* form *H. belli* (Nemata: Pratylenchidae). **Revta. Nematol.**, v. 14, p. 165-180, 1991.

GOLOVATCH, S.I.; HOFFMAN, R.L.; ADIS, J.; MORAIS, J.W. Identification plate for the millipede orders populating the neotropical region south of central Mexico (Myriapoda, Diplopoda). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, v. 30, n. 3, p. 159-164, 1995.

GOLOVATCH, S.I. On the main patterns of millipede diversity in Eurasia. **Senckenbergiana biologica**, Frankfurt, v. 77, n.1, p. 101-106, 1997.

GREILHUBER, J. Chromosomal evidence in Taxonomy. In: Heywood, V.H.; Moore, D.M. **Current concept in Plant Taxonomy**. London, Academic Press, cap.9, p. 157, 1984.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of LEVAN et al. **Revta. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986.

HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 1, p. 55-63, 1992.

HAYMER, D.S.; McINNIS, D.O. Resolution of population of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. **Genome**, Ottawa, v. 37 n. 2, p. 244-248, 1994.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1016, 1980.

HOFFMAN, R.L. **Classification of the Diplopoda**. Genebra: Museum D'Historie Naturalle, 1979, 238p.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Practical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). **Amazoniana**, v. 14, p. 1-35, 1996.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I. ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: ADIS, J. (ed.) **Amazonian Arachnida and Myriapoda**. Bulgaria, Pensoft Publishers Sofia-Moscow, p. 503-533, 2002

HOPKIN, S.P., READ, H.J. **The biology of millipedes**. Oxford. Oxford University Press, 1992.

HUNTER, R.L.; MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, v. 125, p. 1254-1255, 1957.

JOHN, B.; KING, M.; CONTRERAS, N. population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. 2. Molecular characterization of the distal C-band polymorphism. **Chromosoma**, Berlin, v. 94, n. 1, p. 45-58, 1986.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK, W.C.; RAI, K.S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 6, p. 939-945, 1992.

KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, Berlin, v. 80, n. 2, p. 191-217, 1980.

KING, M. The evolution of heterochromatin in the amphibian genome. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Londres: Academic Press, 1991, p. 359-391.

KING, M. CONTRERAS, N.; HONEYCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) show by 18S+28S in situ hybridization. **Genetica**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 17-29, 1990.

KING, M; JOHN, B. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma**, Berlin, v. 76, n. 2, p. 123-150, 1980.

LANDRY, B.S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Myrmaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**, Ottawa n. 36, p. 580-587, 1993.

MAPATUNA-YASANTHA et al. Unravelling the taxonomic status of the genus *Cynopterus* (Chiroptera: Pteropodidae) in Sri Lanka by multivariate morphometrics and mitochondrial DNA sequence analysis. **Mamm. Biol.** v. 67, p. 321-337, 2002.

McKILLUP, S.C.; BAILEY, P.T. Prospects for the biological control of the introduced millipede *Ommatoiulus moreletii* (Lucas) (Iulidae) in South Australia, In:

Proc. Of the 7th Intern. Congress. Of Miriap. (ed. MINELLI, A.), p. 265-270, E.J. Brill, 1990.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M (1983) Ultrastructure des organes sensoriels de l'antenne de *Polyxenus lagurus* (Diplopode, Penicillate). III. Les sensilles coeloconiques des 6e. et 7e. articles antennaires. **Ann. des Sci. Natur.** Zool., 13, 5, 207-220.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M. Ultrastructure des cônes sensoriels apicaux et des sensilles basiconiques spiniformes du 7e. article des antennes de *Typhoblaiulus lorifer* et *Cylindroiulus punctatus* (Diplopodes, Iulides). **Ann. des Sci. Natur. Zool.**, v. 13, n. 7, p. 67-88, 1985.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M. Connaissances actuelles déduites de l'étude ultrastructurale des sensilles, sur le rôle de l'antenne dans la perception des stimuli chez les myriapodes. In. **Proc. of the 7th Intern. Congress of Myriap.** (ed. Minelli, A.), pp. 97-108, E.J. Brill, 1990.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M. Comparative ultrastructure of the apical antennal cones of two blaniulid millipedes: the cave-dwelling *Blaniulus lorifer* (Brolemann, 1921) and the edaphic *Blaniulus guttulatus* (Bosc, 1972). **Mem. Biospeol.** v. 23, p. 237-240, 1996.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M. Fine structure and possible functions of antennal sensilla in *Polyxenus lagurus* (Diplopoda, Penicillata, Polyxenidae). **Ent. Scand. suppl.**, v. 51, p. 167-178, 1997.

NGUYEN DUY-JACQUEMIM, M.; ARNOLD, G. Spatial organization of the antennal lobe in *Cylindroiulus punctatus* (Leach) (Myriapoda: Diplopoda). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, v. 20, n. 415, p. 205-214, 1991.

PERUQUETTI, R. C. Dimorphism among males of *Euglossa mandibularis* Friese (Apidae, Euglossina). **Rev. Bras. Zool.**, São Paulo, v. 19, p. 1223-1226, 2002.

PISANI, J. F. et al. Análise estatística da estrutura interespecífica dos *Bombus* do Brasil, **Zoológica**, 2(8): 101-120, 1966.

PRADO, R. A.; FONTANETTI, C.S. Citogenética de *Pseudonannolene silvestris* (Diplopoda, Pseudonannolenidae): bandamento C, AgNOR e FISH com sonda de rDNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n.3, p.4, 2000.

RIBEIRO, P.A.O. **Teste de Primers para Distinção de Gêneros e Espécies Próximas em Temitidae (ISOPTERA, INSECTA) com Uso da Técnica de RAPD**. 2001. 18p. Monografia (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

RIESEBERG, L.H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology**, Oxford, n. 5, p. 99-105, 1996.

ROMELL, L.S. An example of Myriapodes as mull formers. **Ecology**, Tempe, v. 16, n.1, p. 67-71, 1935.

ROUT, G. R. Evaluation of genetic relationship in *Typhonium* species through random amplified polymorphic DNA markers. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 127-130, 2006.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6^a ed., Roca, SP/SP, 1029p.+ 16g +28IR, 1996.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados, 7^a ed., Roca, SP/SP, 1145p., 2005.

SAIKI, S.K. et al. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for restriction site analysis for diagnosis of sickle – cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCHUBART, O. Os Myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.

SCHUBART, O. Os diplopodas de Pirassununga. **Acta Zool. Lilloana del Instituto " Miguel Lillo"**, Tucuman, v. 2, 321-440, 1944.

SCHUBART, O. Contribuição para a Fauna do Estado de São Paulo II. Os Rhinocricidae (Opisthospermophora, Diplopoda). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 23, n.2, p. 221-275, 1951.

SCHUBART, O. Novas Espécies Brasileiras de família Rhinocricidae (Diplopoda, Opisthospermophora). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 69-87, 1962a.

SCHUBART, O. Um Novo Gênero da Família Rhinocricidae da Bahia (Opisthospermophora, Diplopoda). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 265-268, 1962b.

SHARMA, G.P.; HANDA, S. M. Comparative caryological studies on gonoplectus malayus and Phyllogonostreptus nigrolabiatus (Diplopoda: Myriapoda). **Cytologia**, Tokio, v. 39, n. 4, p. 673-680, 1974.

SMITH, J. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; LEADBETTER, J. R.; BUSH, G.; ROBERTS, D. L.; FULBRIGHT, D. W. Characterization of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 3, p. 135-145, 1994.

SMITHIS, O. Zone electrophoresis in starch gels group variation in the serum proteins of normal human adult. **Biochemical Journal**, London, v. 61, p. 629-641, 1955.

SOUZA, T. S.; KASAHARA, S.; FONTANETTI, C. S. Caracterização cromossômica de uma nova espécie de Pseudonannolene (Diplopoda: Pseudonannolenida). **48^o Congresso Nacional de Genética, Resumo CD**, Águas de Lindóia, 2002.

SOUZA, T. S.; PRADO, R. A.; FONTANETTI, C. S. High content of constitutive heterochromatin in two species of Pseudonannolene (Diplopoda). **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 1, p. 47-51, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TANABE, T. Karyotypes of four Xystodesmid millipedes from Japan. **Acta Arachnologica**, Osaka, v. 41, n. 1, p. 87-90, 1992.

VANBRUNT, J. Amplifying genes: PCR and its alternatives. **Biotechnologie**, v. 8, p. 28-31, 1990.

VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; CAFUTO, V.; SPARACIO, I.; BARBIERI, R. High heterochromatin content in somatic chromosomes of two unrelated species of Diplopoda (Myriapoda). **Chrom. Research**, Oxford, v. 5, p., 407-412, 1997.

VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; MANDRIOLI, M.; PIERRONE, A. M.; GRISPO, G.; BARBIERI, R. 18S- 28S e rDNA is interdispersed throughout heterochromatin in the millipede *Enologus oxypygeum* (Diplopoda). **Genetica**, Dordrecht, v. 110, p. 151-155, 2001.

WHITE, M.J.D. The present status of Myriapod Cytogenetics. In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres: Academic Press, p. 3-8, 1979.

WILLIAMS, G.K. RUBELIK, A. R.; LIVARK, K.J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-35, 1991.

WILLIAMS, J. G. K.; HANFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, p. 704-740, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)