

Posição sistemática — Miriápodo da ordem Diplópoda, subordem Chilognatha, tribu Proterândria, família Rhinocricidae.

Material e métodos : Os indivíduos foram obtidos no parque da Escola. A dissecação foi feita sob Ringer; 3 indivíduos foram fixados em Allen-Bauer e coloridos com hematoxilina e 11 foram fixados em San Felice e coloridos com Feulgen. Foram feitos esfregaços de vários indivíduos em acetoorceina sem prévio tratamento, enquanto outros foram submetidos à ação do KCN (2.1/1000 M) ou do KNO³ (10%), métodos preconizados para despiralização dos cromonemas, o primeiro por **Oura** (1936) e o segundo por **Brieger** (1939).

Os machos apresentam um grande número de tubos testiculares, na parte ventral do corpo, ligados a um canal central que se abre entre o 2^o. e o 3^o. par de patas.

Meiose — Nas partes periféricas dos testículos mais velhos, ou mesmo na central dos jovens, aparecem grandes células com um novêlo cromático pálido encerrando um nucléolo esférico grande e diversos corpúsculos de tamanho variável, que se colorem fortemente pelo Feulgen, que são como veremos mais tarde formados pela reunião de partes heterocromáticas dos cromossômios. O novêlo cromático vai se tornando mais denso e contraíndo-se para um lado do núcleo, apresentando o aspecto típico da sinítese. Nesta fase distinguem-se no novêlo as zonas heterocromáticas, fortemente coloridas e as zonas eucromáticas mais pálidas. Parece haver uma tendência das zonas heterocromáticas de se colocarem na periferia do núcleo. (Fig. 1).

Não há evidência de cromossômios sexuais.

Progredindo a meiose, aparecem no núcleo, os cromossômios pareados, alguns com abertura mediana, um ou dois em forma de anel, e finalmente cordões com as extremidades bem espessas, forma essa que parece ser posterior às primeiras. (Fig. 2).

Continuando a contração, os cromossômios entram em metáfase com o aspecto característico de bivalentes, apresentando medianamente uma parte mais fina, examinados em vista lateral. (Fig. 3). Em vista polar, mudando-se o foco, contam-se 10 pares de esferas superpostas. (Fig. 4). Alguns bivalentes progridem na meiose mais rapidamente que os outros, sendo mui-

to comum encontrarem-se células com o fuso formado, e alguns bivalentes fora do plano equatorial, ainda não orientados para a divisão; alguns bivalentes entrando em anáfase antes dos outros, dão, em vista polar, a impressão de um número maior de cromossômios.

Os cromossômios entram em anáfase separando-se pela parte mais fina, apresentando-se nas anáfases mais adiantadas em forma de V. (Fig. 8 e 9).

Nas células bem favoráveis foi possível contar, na metáfase, 10 pares de cromossômios em divisão, no entanto nos espermátocitos de 2a. ordem foram encontrados 8, 9 e 10 elementos. (Fig. 10).

Essa variação no número de unidades encontrada nos espermátocitos secundários tem uma explicação clara no comportamento dos cromossômios na primeira divisão. Há uma tendência para uma fusão dos bivalentes. Com relativa frequência, são encontradas células onde 2 cromossômios homólogos conjugados se fundem com outros 2, ou 4 bivalentes se fundem 2 a 2. Em algumas células esses cromossômios parecem estar superpostos, mas em outras a fusão é evidente. (Fig. 5). A figura 6 representa 2 pares de cromossômios nos quais realizou-se uma fusão completa entre os não homólogos de cada par, enquanto entre os outros dois a fusão não foi perfeita; no entanto o conjunto dos outros dois cromossômios fundidos está ligado aos outros 2 por dois conectivos e não apenas por um como acontece nos bivalentes simples. A figura 7 é uma diacinese com 8 bivalentes simples e dois fundidos. Como consequência destas fusões, os espermátocitos secundários apresentarão 9 ou 8 cromossômios, conforme a fusão tenha sido apenas entre 2 pares ou entre 4 pares 2 a 2. Em muitas células da 2a. divisão é possível, nas que apresentam 9 ou 8 cromossômios, identificar-se um ou dois elementos duplos. Um número maior de cromossômios fundidos na mesma célula pode ocorrer, pois foram encontradas também células de 7, 6 e até de 5 cromossômios, porém raramente.

Para verificar a correlação entre o fenômeno da fusão dos cromossômios e o aparecimento das metáfases secundárias de 8, 9 e 10 elementos, contei nas lâminas correspondentes a 4 indivíduos, cujos cortes foram feitos com espessura de 20 a 30 microns, as células de 10, 9 e 8 cromossômios, nas metáfases primárias e secundárias, abrangendo um total de 190 células e apliquei o teste X².

As contagens estão figuradas no quadro abaixo.

| indivíduos | metáfases primárias | | | | metáfases secundárias | | | |
|------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------|-----------------------|-------------|------------------------|--|
| | 10 pares e 1 fusão | 8 pares e 2 fusões | nº de metáfases 1 rias | 10 elementos | 9 elementos | 8 elementos | nº de metáfases 2 rias | |
| 1 | 24 | 6 | 33 | 6 | 7 | 5 | 18 | |
| 2 | 28 | 18 | 55 | 24 | 16 | 11 | 51 | |
| 3 | 9 | 7 | 20 | — | — | — | — | |
| 4 | 10 | 2 | 12 | — | 1 | — | 1 | |
| | 71 | 33 | 16 | 30 | 24 | 16 | | |

S = 120

S = 70

Aplicando o teste X²

$$X^2 = \frac{(f. \text{ obs.} - f. \text{ esp.})^2}{f. \text{ esp.}}$$

Cálculo do “esperado”: A frequência esperada foi calculada relacionando o número total de células com o número de metáfases primárias e o número de células que apresentam 10 cromossômios, 9 e 8 ou seja, nenhuma fusão, fusão de 2 bivalentes, e fusão de 4 bivalentes 2 a 2, respectivamente. Por exemplo, o primeiro esperado: O número total de células é 190, o número de metáfases primárias 120, e o número de células sem nenhuma fusão, na primeira ou na segunda divisão, 101.

$$\frac{120 \times 101}{190} = 63,789$$

O quadro abaixo dá o valor de todos os X², individuais e totais.

| n. de cromos. | | (desvio) ² | X ² | (desvio) ² | X ² | |
|---------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----|
| 10 | obs | 71 | | 30 | | 101 |
| | esp | 63,79 | | 37,21 | | |
| | desvio + | 7,21 | 51,9841 | 0,81 | — 7,21 | |
| 9 | obs | 33 | | 24 | | 57 |
| | esp | 36 | | 21 | | |
| | desvio — | 3 | 9 | 0,25 | + 3 | |
| 8 | obs | 16 | | 16 | | 32 |
| | esp | 20,21 | | 11,79 | | |
| | desvio — | 4,21 | 17,7241 | 0,88 | + 4,21 | |
| | | 120 | | 70 | | 190 |
| | | | X ² = 1,94 | | X ² = 3,33 | |

Para grau de liberdade 1, dos X² individuais, temos os limites:

$$\begin{aligned} \text{nf} = 1 \quad & 5\% - 3,8 \\ & 1\% - 6,6 \text{ (Brieger, 1937)} \end{aligned}$$

Examinando-se os resultados de todos os X^2 isolados, com êsses valores, vemos que todos êles são insignificantes. Também X^2 total, tanto para metáfases primárias como secundárias, comparados com os valores abaixo, correspondentes a $\text{nf}=2$, são insignificantes.

$$\begin{aligned} \text{nf} = 2 \quad & 5\% - 6,0 \\ & 1\% - 9,2 \text{ (Brieger, 1937)} \end{aligned}$$

O mesmo teste foi aplicado para a metáfase primária do indivíduo 1, e para a primária e secundária do indivíduo 2, isoladamente. A frequência esperada foi sempre calculada relacionando o número total de células dos 4 indivíduos, o número de metáfases primárias ou o de metáfases secundárias, com, respectivamente, o número total de células sem nenhuma fusão dos 4 indivíduos, com fusão de dois bivalentes e com fusão de 4 bivalentes 2 a 2.

Para o indivíduo 1, o teste foi aplicado só para as metáfases primárias devido ao pequeno número de metáfases secundárias. As frequências esperadas são as seguintes:

$$\begin{array}{ccc} \frac{33 \times 101}{190} = 17,54 & \frac{33 \times 57}{190} = 9,9 & \frac{33 \times 32}{190} = 5,56 \end{array}$$

Indivíduo 1 (só metáfases primárias)

| n. de cromossômios | | (desvio) ² | X^2 |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------|
| 10 | obs 24 esp 17,54 desvio + 6,46 | 41,7316 | 2,38 |
| 9 | obs 6 esp 9,9 desvio - 3,9 | 15,21 | 1,54 |
| 8 | obs 3 esp 5,56 desvio - 2,56 | 6,5536 | 1,18 |

$$X^2 = 5,10$$

Tanto os resultados isolados (1 grau de liberdade) como o total (2 graus de liberdade) são insignificantes.

Também o mesmo resultado foi encontrado para as metáfases primárias e secundárias do indivíduo 2, como mostram os quadros abaixo.

Frequência esperada :

$$\frac{55 \times 101}{190} = 29,24$$

$$\frac{55 \times 57}{190} = 16,5$$

$$\frac{55 \times 32}{190} = 9,26$$

Indivíduo 2 (só metáfases primárias)

| n. de cromossômios | | (desvio) ² | X ² |
|--------------------|--|-----------------------|----------------|
| 10 | obs 28 esp 29,24 desvio — 1,24 | 1,5376 | 0,0526 |
| 9 | obs 18 esp 16,5 desvio + 1,5 | 2,25 | 0,1400 |
| 8 | obs 9 esp 9,26 desvio — 0,26 | 0,0676 | 0,0073 |

55

X² = 0,1999

Frequência esperada para as metáfases secundárias do indivíduo 2.

$$\frac{51 \times 101}{190} = 27,11$$

$$\frac{51 \times 57}{190} = 15,3$$

$$\frac{51 \times 32}{190} = 8,589$$

Indivíduo 2 (só metáfases secundárias)

| n. de cromossômios | | (desvio) ² | χ^2 |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------|
| 10 | obs 24 esp 27,11 desvio - 3,11 | 9,67 | 0,360 |
| 9 | obs 16 esp 15,3 desvio + 0,7 | 0,49 | 0,032 |
| 8 | obs 11 esp 8,59 desvio + 2,4 | 5,76 | 0,670 |

51

 $\chi^2 = 1,062$

Todos os valores de χ^2 individuais assim como total estão abaixo do limite correspondente a 5%, são portanto insignificantes.

Essa fusão de cromossômios não homólogos já existe na literatura nos trabalhos de HARRY FEDERLEY e também de SEILERS e HANIELS, estes últimos citados pelo primeiro, como veremos adiante.

A segunda divisão não apresenta dificuldades, separando-se todos os cromossômios, pela parte mais fina, colocada no plano equatorial. (Fig. 11).

Foram encontradas algumas metáfases espermatogonais mas em nenhuma delas o número de cromossômios pôde ser contado com exatidão, estando entre 18 e 20. Nas paredes de um testículo apareceram células em mitose e em uma delas, mais favorável, foi possível contar 20 cromossômios. (Figs. 12 e 13).

Nas células em repouso de todo o corpo, e mesmo nos espermátócitos que iniciavam a meiose foram notadas manchas Feulgen-positivas — cromocentros. Por sugestão de Dr. Rhoades experimentei tratar os testículos pelos métodos próprios

para a dissolução da matriz e distensão dos cromatídios. Os métodos que deram melhores resultados foram o tratamento pelo KNO_3 a 10% (Brieger) durante 15 minutos a 1/2 hora, e o tratamento pelo KCN, solução 2.10^{-3}M (Oura), durante 1 a 2 horas.

Com estes métodos foram obtidas metáfases com os cromossômios distendidos deixando perceber a espiral formada pelos cromatídios. Ainda por este tratamento as manchas Feulgen positivas, citadas atrás, os cromocentros, começaram a se desmanchar em espirais, ficando evidenciado que elas são formadas pelas zonas heterocromáticas dos cromossômios. O número e o tamanho delas é variável, e provavelmente estas zonas podem se fundir em outras maiores. Deve ser um caso semelhante ao de algumas linhagens de milho, examinadas por MORGAN (1943). Aqui o material heterocromático é representado pelos "knobs", cromômeros, o organizador nuclear do cromossômio 6, e a região adjacente ao centrômero em alguns cromossômios, e ainda pelos cromossômios B. No núcleo intercinético, geralmente o organizador nucleolar se funde com os 2 nucléolos, os "knobs" e os cromossômios B dão origem cromocentros, e as regiões heterocromáticas adjacentes aos centrômeros podem ser relacionadas com as áreas difusas de heterocromatina. Foi encontrada uma boa correlação entre o número de cromocentros no núcleo intercinético e o número de "knobs" presentes nos cromossômios paquítenicos, como também entre o número de cromossômios B, nas linhagens sem "knobs" distintos. Também nos núcleos salivares de *Drosophila* o cromocentro aparece como uma massa formada pela fusão de todas as regiões heterocromáticas vizinhas aos centrômeros. (WHITE, 1945).

Além das células da linhagem germinal, aparecem nos testículos, já cheios de espermatozóides, células muito grandes com os cromossômios irregularmente distribuídos. Assim é que num fuso bem formado aparecem grandes massas cromossômicas distendidas em direção aos polos, dando a idéia de uma fusão de cromossômios. (Fig. 14). Estas células de divisão muito irregular não pertencem à linhagem germinal, e devem corresponder às células de nutrição descritas por Verhoeff na espermatogênese dos Quilópodos, citado por BÜCHERL (1939).

DISCUSSÃO

Na literatura ao meu alcance, encontrei apenas, em um livro de SCHRADER (1928) um pequeno resumo sobre a determinação sexual em Myriapoda. Esse autor conclui que seja provável que em Myriapoda os machos sejam heterogaméticos e usualmente do tipo XO; no entanto em *Rhinocricus padbergi* isso não se verifica.

Schrader coloca em Myriapoda, os myriapodos e os chilopodos. Aproveitei só a literatura referente a Myriapoda, porquanto hoje os Chilopodos formam uma classe à parte. Para Myriapoda esse autor cita os trabalhos de OETTINGER (1908, 1909) e SOKOLOFF (1914).

OETTINGER (1908, 1909). Estudou a espécie *Pachyiulus varius* Fab. Os espermatozóitos possuem 24 autossômios e um sexocromossômio em forma de bastonete, bem maior que os autossômios. Os espermatozóitos primários depois da sinapse apresentam 25 cromossômios. Não houve portanto redução. Na metáfase aparecem os cromossômios reunidos 2 a 2, formando os bivalentes.

SOKOLOFF (1914). Trabalhou em *Polyxenus*. Seu trabalho refere-se mais à formação dos espermatozóides. A meiose é ortodoxa, sendo 8 o número haplóide de cromossômios. A primeira divisão é equacional e a segunda reducional. Não há referência a cromossômio sexual.

FUSÃO DE CROMOSSÔMIOS. OS TRABALHOS DE FEDERLEY

Uma afinidade secundária, resultando na associação de dois cromossômios em um, uma fusão de cromossômios, já vem sendo apresentada desde 1932, por Federley, em seus trabalhos sobre híbridos em Lepidoptera. Do cruzamento entre raças e entre espécies diferentes de Lepidópteros conseguiu Federley vários híbridos com uma diminuição no número de cromossômios, o que ele atribui a uma fusão.

Cruzando duas raças de *Dicranura vinula*, a fennica e a germanica, ambas com o número haplóide de cromossômios 21,

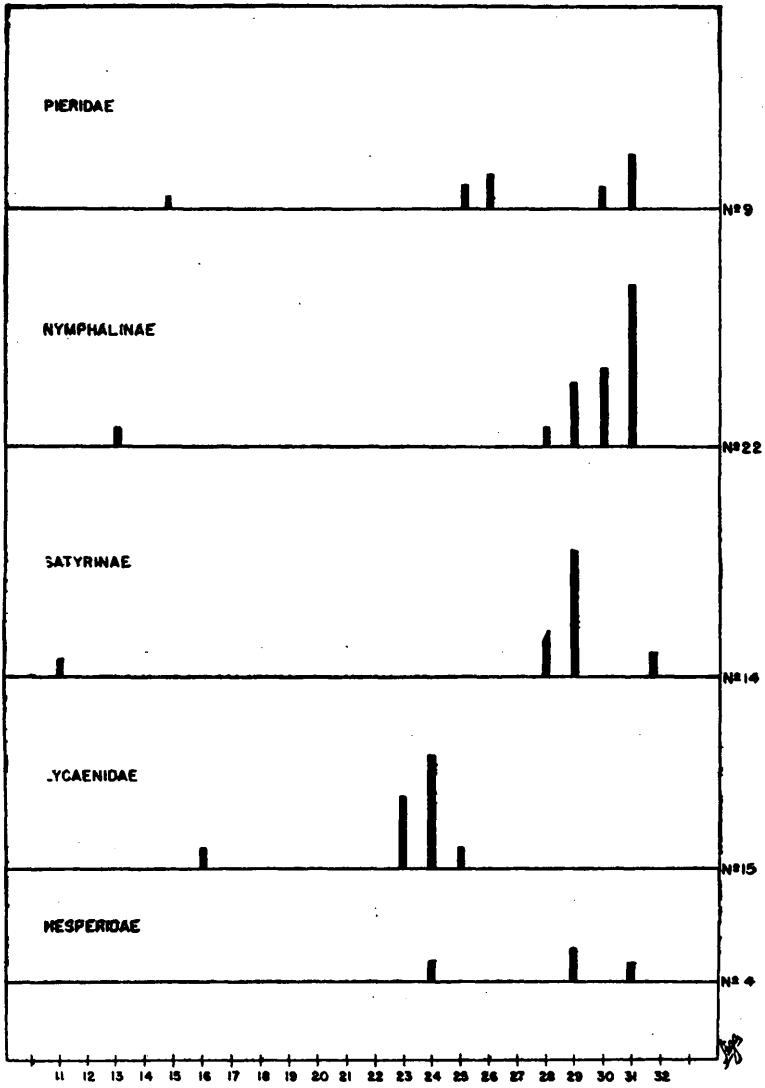
Federley obteve híbridos, que na sua maioria não apresentavam, na divisão de maturação, 21 cromossômios como os pais, mas apenas 20 tanto na espermatogênese como na ovogênese. Contagens de cromossômios feitas em 3 ovos de híbridos revelaram os números 40,41 e 42 acidentalmente distribuídos.

Do cruzamento entre duas espécies muito próximas de Sphingidae, uma fêmea de *Dellephila galli* Rott e um macho de *Dellephila euphorbiae* L, ambas com o número haplóide de cromossômios 29, foram obtidos 5 híbridos. Entre êsses, 4 apresentaram como os pais o número haplóide 29 e alguns poucos espermátocitos com 28 e 30. Um dos híbridos apresentou a grande maioria das células com 28 cromossômios e algumas poucas com 27 e 29.

Outros casos de fusão de cromossômios são citados por Federley em algumas espécies de Nymphalineaes e Lycaenideaes. Em Nymphalineaes aparece uma fusão de dois cromossômios nos oócitos primários de algumas espécies. Assim é que *Argynnis niobe*, *A. adippe* e *A. paphia*, apresentam em regra geral 29 cromossômios nos machos e nas fêmeas as mais das vezes apenas 28 nos gametócitos, e entre êles um muito grande, que muitas vezes mostra um estrangulamento que revela sua natureza composta. Na *Argynnis pales* v. *arsilache* nem sempre parece realizar-se a fusão, de modo que o macho apresenta o número haplóide 30 e fêmea 29 e 30. Em Lycaenidae, na espécie *Lycaena astrarche* o macho possui 23 cromossômios, dentre êles um muito grande, e a fêmea, ao contrário, 24. Em *Lycaena icarus*, no oócito primário aparece um cromossômio grande unido a um menor, podendo-se reconhecer a fusão por não ser muito íntima.

Procedendo a uma análise em várias famílias de Lepidópteros (Ropalóceros), Federley verificou que dentro de cada família as espécies apresentavam sempre um número de cromossômios típico para quase todas, variando em algumas espécies para um número pouco superior ou pouco inferior; no entanto, todas as famílias têm um representante com um número bem menor de cromossômios. O tamanho desses cromossômios é bem maior que o tamanho dos de todas as outras espécies da família.

Reproduzo abaixo a representação gráfica feita pelo citado autor.



Entre as 9 Pieridae, 5 coincidem na classe 30-31, três na classe 25-26, e a espécie *Pieris brassicae* tem apenas 15 grandes cromossômios. Em Nymphalinae, 20 incidem na classe 29-31, uma espécie tem 28 cromossômios, e *Argynnis ino* o baixo número 13, porém cromossômios muito grandes. Entre as Satyrinae, 12 pertencem às classes 28-29, uma espécie possui 32 cromossômios e *Erebia medusa* 11 cromossômios muito grandes. Em Lycaenidae, de 15 espécies examinadas, 13 incidem na classe 23-24, uma tem 25 cromossômios e *Zephyrus betuloe* apresenta 16 grandes cromossômios. Também entre as Hesperidae a espécie *Hesperia alveus* apresenta 24 cromossômios enquanto as outras três espécies apresentam 29 e 31.

A distribuição das espécies nas famílias mostra certa analogia. Em tôdas elas há um ápice mais ou menos pronunciado, onde se localizam quase tôdas as espécies. Mas tôdas as famílias apresentam uma espécie com um número muito pequeno de cromossômios, sendo êstes sempre muito maiores do que nos demais representantes da família.

Outras famílias apresentam ainda distribuição análoga com relação ao número de cromossômios. Entre as Saturniidae e Geometrideas, há um ápice pronunciado em 30-31, 30 para as Saturniidae e 31 para as Geometrideas, e uma espécie com um número muito baixo, 13, em cada família, e entre as Saturniidae ainda uma com o número 19.

Para Federley, esta distribuição do número de cromossômios não é apenas uma casualidade, mas a manifestação de um processo que produz uma fusão de cromossômios, apontando a favor dessa hipótese o considerável tamanho dos cromossômios nas espécies que têm um pequeno número dêles.

Outro exemplo que ainda esclarece a exatidão da hipótese da fusão de cromossômios é o cruzamento da *Dicranura vinula fennica* com *D. vinula delavoelle*, a primeira com 21 cromossômios e a segunda com 31. Federley só pôde examinar um híbrido, notando que um número não muito pequeno de espermátocitos mostra 21 cromossômios e numerosíssimas células da primeira divisão têm um número de cromossômios que apenas excede 21 para poucos cromossômios. Incontestavelmente dos 31 cromossômios de *delavoelle*, dois ou mais se conjugam com um cromossômio de *fennica*.

Muito interessante também é o caso citado por Federley, do trabalho de SEILER e HANIEL (1921). Segundo êses autores a *Lymantria monacha* apresenta muito regularmente, tanto durante a espermatogênese como a oogênese uma fusão de certos cromossômios formando um cromossômio coletivo; as

células somáticas são submetidas de novo a uma fragmentação e retornam ao número primitivo de cromossômios.

SUMMARY

In the present paper the behaviour of the chromosomes in the spermatogenesis of the Myriapod *Rhinocricus Padbergi* Verhoeff, 1938 is studied.

The primary spermatocytes are provided with 10 independent bivalents which separate normally giving rise to equivalent secondary spermatocytes. No indication of sex chromosomes has been found. Fusion of two bivalents or of four, two by two, has been observed, giving origin to secondary spermatocytes with 9 and 8 chromosomes respectively, in which fused chromosomes could be discovered.

For analysing the facts the chromosomes of both, primary and secondary metaphases were separately counted from a total of 190 cells of four individuals and statistically treated. The X²-test gave insignificant results.

Twenty chromosomes were counted in somatic tissues.

The heterochromatic parts of the leptotene threads were usually arranged in the periphery of the nucleus.

In resting nuclei chromocenters can be observed in varying number. Their chromosomal nature is revealed by the fact that when treated by KCN or KNO³ they begin uncoiling.

LITERATURA

BRIEGER, F. G. — 1937. Tabuas e Fórmulas para Estatística. Cia. Melhoramentos de S. Paulo — S. Paulo.

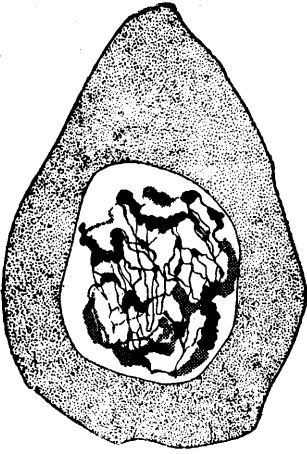
BRIEGER, F. G. — 1939. Estrutura dos cromossômios na meiose. *Jornal de Agronomia*, 2: nº 2.

BÜCHERL, WOLFGANG — 1939. Os Quilopodos do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*. Vol. XIII.

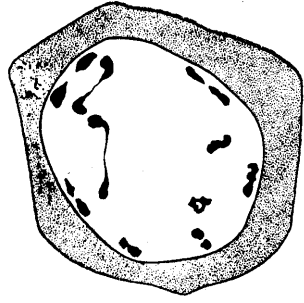
FEDERLEY, HARRY — 1932. The Conjugation of the Chromosomes. *Sixth International Congress of Genetics* 1: 153-164.

FEDERLEY, HARRY — 1937. Fusion zweier Chromosomen als Folge Einer Kreuzung. *Acta Soc. pro Fauna et Flora Fenn* 60.

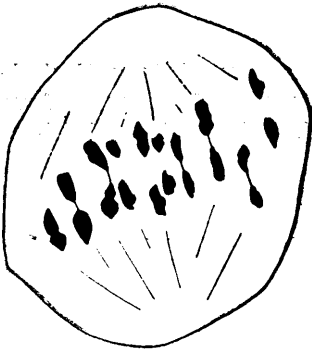
- FEDERLEY, HARRY — 1938. Chromosomenzahlen Finnländischer Lepidopteren. 1 — Rhopalocera. *Hereditas* XXIV.
- FEDERLEY, HARRY — 1943. Zytologische Untersuchungen An Mischlilgen Gattung. *Dicranura* b. (Lepidoptera). *Hereditas* 29
- MORGAN, D. T. JR — 1943. The Formation of Chromocenters in Interkinetic Nuclei of Maize. *Journal of Heredity* XXXIV n. 7.
- OETTINGER, R. — 1908. Zur Kenntnis der Spermatogenese bei den Myriapoden. Samenreifung und Samenbildung von *Pachyiulus varius* Fabr. *Zool. Anz.* 33.
- OETTINGER, R. — 1909. Zur Kenntnis der Spermatogenese bei den Myriapoden. Samenreifung und Samenbildung *Pachyiulus varius* Fabr. *Arch. Zellf.* 3 (Citado por Schrader, 1928).
- OURA, G. — 1936. A New Method of Unravelling the Chromonema Spirals. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik* 53 536-537.
- SCHRADER, F. — 1928. Die Geschlechtschromosomen. Gebrüder Borntraeger — Berlin.
- SEILER, J. e HANIEL, C. B. — 1921. Das verschiedene Verhalten der Chromosomen in Eireifung und Samenreifung von *Lymantria monacha* L. *Z. f. ind. Abst. und Vbgslehre.* XXVII: 81-103.
- SOKOLOFF, J. — 1914. Über die Spermatogenese bei *Polyxenus* sp. *Zool. Anz.* XLIV.
- WHITE, M. J. D. — 1945. *Animal Cytology and Evolution.* University Press. Cambridge. 375 pags.



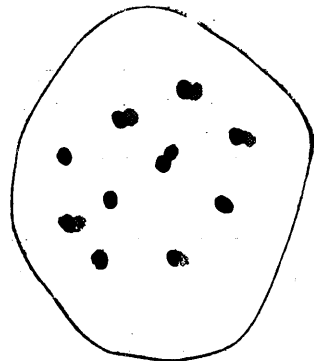
1



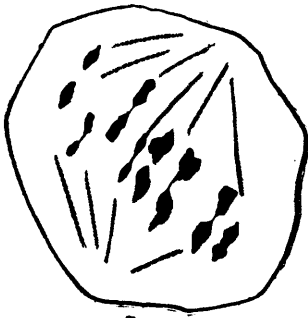
2



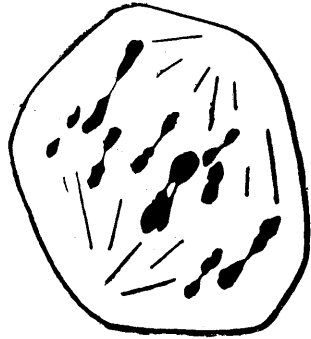
3



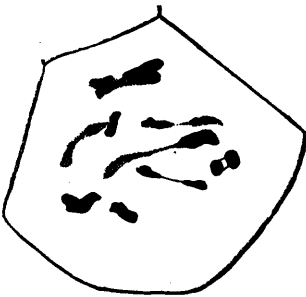
4



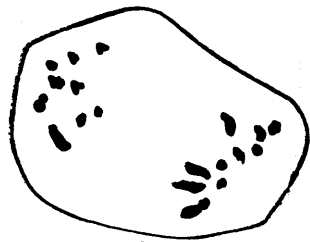
5



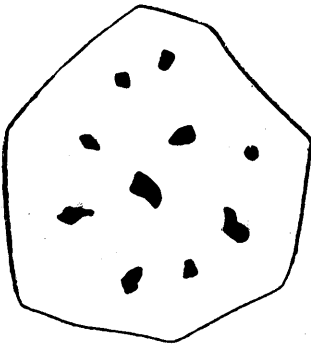
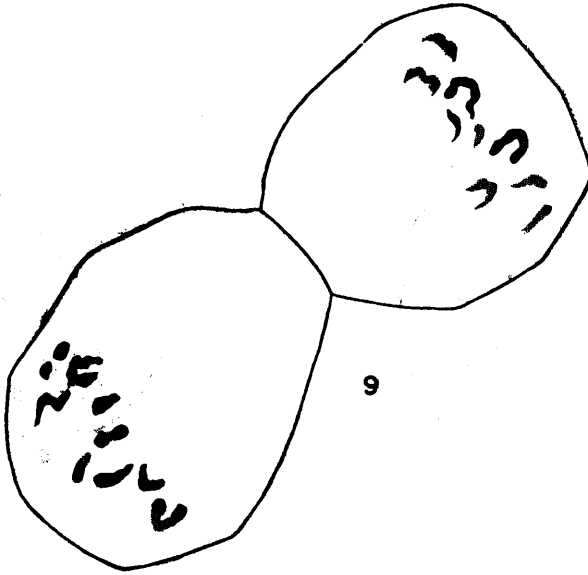
6



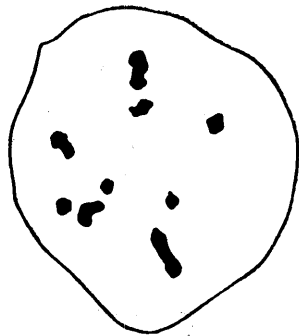
7



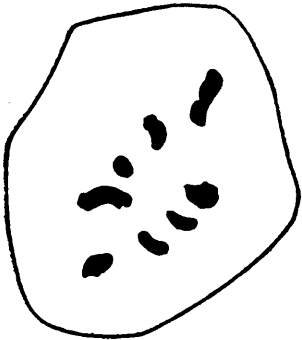
8



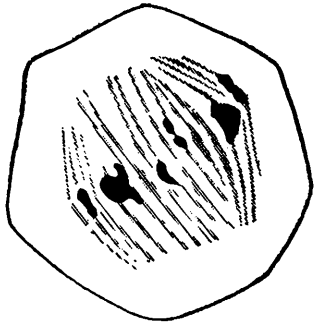
10-A



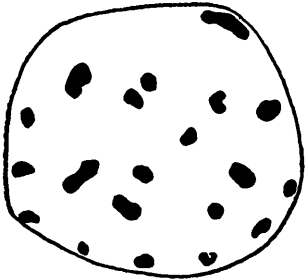
10-B



10-C



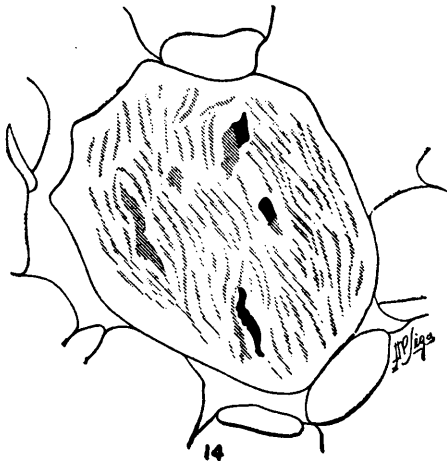
11



12



13



14

