

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**CICLO OVOGENÉTICO E ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DO  
SISTEMA REPRODUTIVO DE ESPÉCIES DA ORDEM**

**POLYDESMIDA (DIPLOPODA)**

**TAMARIS GIMENEZ PINHEIRO**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Tamaris Gimenez Pinheiro**

**Ciclo ovogenético e estudo morfológico comparativo do sistema reprodutivo de espécies da ordem Polydesmida (Diplopoda)**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Co-orientadora: Profa. Dra. Marinêz Isaac Marques

Rio Claro

2013

# **Tamaris Gimenez Pinheiro**

## **Ciclo ovogenético e estudo morfológico comparativo do sistema reprodutivo de espécies da ordem Polydesmida (Diplopoda)**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

### **Comissão Examinadora**

Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Prof. Dr. Leandro Dênis Battirola

Profa. Dra. Izabela Braggião Calligaris

Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo

Profa. Sandra Eloisi Denardi

Rio Claro, 04 de março de 2013

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho:

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, por oferecer a sede e estrutura do Departamento de Biologia e os recursos para aquisição bibliográfica com o VPN UNESP e o sistema COMUT da Biblioteca, os quais facilitaram muito o acesso à literatura referente ao grupo estudado.

À Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Instituto de Biociências, por ceder as instalações do Laboratório de Ecologia e Taxonomia de Artrópodes (LETA) e da Base Avançada de Pesquisas do Pantanal, localizada na Estância Ecológica SESC-Pantanal, em Porto Cercado, para a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) pelo apoio sempre que necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílio técnico que proporcionaram a coleta e aquisição de material necessário para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU/MCT/CNPq/UFMT) e ao PRONEX/2009 (FAPEMAT/CNPq) pelo apoio logístico disponibilizado ao projeto.

À Professora Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado, apoio e amizade durante esses quase quatro anos.

À Professora Marinêz Isaac Marques, minha co-orientadora, pela parceria de longa data, apoio, amizade e exemplo de força e determinação.

Aos Professores Sergei Golovatch, pesquisador do *Institute for Problems of Ecology and Evolution*, Academia Russa de Ciência, Moscou, e Fernando José Zara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia e Zoologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro pelo convívio, aprendizado e oportunidades.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro: Gerson, Antônio, Mônica e Pablo e à Cris, desenhista, pelo convívio, ajuda, companheirismo, dicas e amizade.

Ao Sr. Adolfo e D. Doca, auxiliares de serviços gerais da Base Avançada de Pesquisas do Pantanal da UFMT, pelo enorme auxílio e imenso carinho que dispensaram durante as coletas.

Aos colegas dos Departamentos de Biologia e Zoologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro e a todos os “fofoletes” pelos bons momentos que passamos juntos. Às colegas da UFMT: Eliandra, Silvana, Ana Silvia e Laysa Amorim que auxiliaram imensamente durante as coletas tornando-as momentos muito mais agradáveis. Expresso aqui minha sincera gratidão a tod@s pela amizade.

Aos meus amados e estimados pais, Modesto e Neide, aos meus queridos irmãos e sobrinha, Tatiana, Wladimir e Carol e aos meus amados esposo e filho, Edson e Samuel, registro aqui minha infindável gratidão pelo apoio, compreensão, carinho e força neste período de crescimento profissional e pessoal. VOCÊS SÃO A RAZÃO DE TUDO ISSO.

## RESUMO

Pouco se sabe sobre a dinâmica reprodutiva dos diplópodos em seu habitat natural. Em áreas inundáveis como o Pantanal matogrossense, estes organismos desenvolvem estratégias de sobrevivência para suportar as alterações cíclicas do regime hídrico. Diante disso, este estudo visou descrever a estrutura ovariana e o ciclo ovogenético de três espécies de diplópodos da ordem Polydesmida: *Poratia salvator* e *Myrmecodesmus hastatus*, encontradas em áreas inundáveis e não inundáveis do Pantanal matogrossense, e *Telonychopus klossae*, que ocorre no município de Cuiabá, Mato Grosso. Além disso, visou fazer um estudo comparativo da morfologia ovariana dessas espécies, a fim de contribuir para discussões sobre a evolução morfológica deste sistema no grupo. Os indivíduos foram coletados trimestralmente, de dezembro de 2009 a janeiro de 2012, por meio de busca ativa. Parte das fêmeas amostradas foi dissecada, fixada, emblocada e processada para estudos histológicos e histoquímicos e outra foi destinada ao estudo ultramorfológico. *Poratia salvator* e *M. hastatus* (Pyrgodesmidae) apresentaram ovário como um órgão tubular único. *Telonychopus klossae* (Chelodesmidae) possui ovário pareado com presença de ovissacos. O ovário não pareado parece ser uma apomorfia, aparentemente, associada ao tamanho diminuto destas espécies e suas curtas histórias de vida; a condição pareada seria simplesiomórfica e mais comum para as famílias de Polydesmida. Os ovócitos apresentam três estágios de desenvolvimento, diferenciados por caracteres como tamanho, aspecto do ovoplasma e deposição do cório. Com relação aos componentes das células germinativas, a deposição de lípidos foi primeiramente observada, seguida pela deposição de proteínas, carboidratos e cálcio. Estes elementos são derivados tanto de fontes endógenas quanto exógenas. Em todos os períodos sazonais do Pantanal ocorreram fêmeas de *P. salvator* e *M. hastatus* com ovócitos em estágio III (desenvolvidos ou vitelogênicos), entretanto, a vazante foi o período com menor frequência relativa de fêmeas com ovócitos nesse estágio de desenvolvimento, além do menor número médio de ovócitos vitelogênicos registrado. O maior número médio de ovócitos vitelogênicos para *P. salvator* e *M. hastatus* foi registrado durante a seca e enchente, respectivamente. Os períodos de enchente e cheia foram os de maior frequência absoluta de fêmeas com ovócitos vitelogênicos e a maior porcentagem de fêmeas com os maiores valores de ovócitos neste estágio. Houve

correlação negativa fraca entre a pluviosidade média e o número médio de ovócitos, e entre o comprimento total das fêmeas e o número de ovócitos em estágio III. Dessa forma, pode-se afirmar que essas duas espécies reproduzem-se continuamente durante o ano, com um incremento em sua reprodução durante os períodos de enchente e cheia; como este último período é bastante crítico por provocar uma maior mortalidade dos juvenis devido à alta pluviosidade, os períodos seguintes (vazante e seca) são afetados, caracterizando-se como os de menor número de fêmeas reprodutivamente viáveis. O desenvolvimento completo de *T. klossae* é anual, com sua reprodução iniciando em dezembro, se estendendo até maio; a espécie permanece inativa em câmaras de muda de junho a novembro.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento ovocítico; milípedes neotropicais; morfologia ovariana; Pantanal; período reprodutivo.

## ABSTRACT

Little is known about the reproductive dynamics of the diplopods in their natural habitat. In wetlands, these organisms develop survival strategies to withstand the cyclical changes of the water regime. Thus, this study aims to describe the ovarian structure and the oogenetic cycle of three diplopods species in the order Polydesmida: *Poratia salvator* and *Myrmecodesmus hastatus*, found in flooded and non-flooded areas of the Pantanal of Mato Grosso, and *Telonychopus klossae*, that occurs in the Cuiabá city, Mato Grosso. Moreover, it aims to make a comparative study of the ovarian morphology of these species for to contribute with discussions about the morphological evolution of this system in the group. The animals were collected quarterly from December 2009 to January 2012 through active search. Part of the sampled females was processed for histological and histochemical investigation and other part was intended for ultrastructural study. *Poratia salvator* and *M. hastatus* (Pyrgodesmidae) had an unpaired ovary that formed a tubular organ containing oocytes. *Telonychopus klossae* (Chelodesmidae) had a paired ovary with ovisacs. The unpaired ovary appeared to be apomorphic and was associated with the small size of these species and their short life cycle; the paired condition was symplesiomorphic, commonest to Polydesmida families. The oocytes in these species have three stages of development, which were differentiated by size, aspect of ooplasm and deposition of the chorion. With respect to the components of germ cells, the lipid deposition was noted first, followed by the deposition of proteins, carbohydrates and calcium. These elements are derived either from endogenous sources as exogenous. In all Pantanal seasons occurred females of *P. salvator* e *M. hastatus* with oocytes in stage III (developed or vitellogenic); however, the period of low water presented the lower relative frequency of females with oocytes in this development stage, beyond the lowest average number of vitellogenic oocytes. The higher number of vitellogenic oocytes for *P. salvator* and *M. hastatus* were recorded during the dry and rainfall seasons, respectively. The flood and hight water periods were those with the highest absolute frequency of females with vitellogenic oocytes, and the highest percentage of females with the highest values of oocytes at this stage. There was a weak negative correlation between the average rainfall and the mean of oocytes numbers and between the female total length and oocytes numbers in the stage III. Thus it can be stated that the species reproduce continuously



throughout the year, with an increase in the reproduction during the flood and high water periods; as this last period is quite critical for causing higher mortality of juveniles due to high rainfall, the following periods (low water and dry season) are affected, characterized as the least number of reproductively viable females. The complete development of *T. klossae* is annual, with reproduction starting in December, lasts until May; the species remaining inactive in moulting chambers from June to November.

**Keywords:** Developing oocyte; neotropical millipedes; ovarian morphology; Pantanal; reproductive period.

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL .....	11
II. OBJETIVOS .....	16
III. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
IV.1. Áreas de coleta .....	26
IV. 2. Procedimentos em campo .....	26
IV. 3. Procedimentos em laboratório .....	28
IV. 3. 1. Histologia dos ovários .....	28
IV. 3. 2. Histoquímica .....	28
IV. 3. 2. 1. Polissacarídeos .....	28
IV. 3. 2. 2. Proteínas .....	29
IV. 3. 2. 3. Lipídios .....	29
IV. 3. 2. 4. Cálcio .....	29
IV. 3. 3. Ultramorfolgia (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV) .....	29
IV. 4. Análises dos dados do ciclo ovogenético .....	30
V. RESULTADOS .....	32
Artigo 1	
PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. Ovarian morphology and oocyte development in three species of polydesmids diplopods .....	33
Artigo 2	
PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. Comparative study of the ovarian morphology in the order Polydesmida (Diplopoda) and description of unusual structures in the female reproductive system .....	61

Artigo 3

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; BATTIROLA, L. D.; FONTANETTI, C. S.  
Oogenetic cycle and reproductive strategies in two species of millipede  
(Diplopoda) from Pantanal of Brazil ..... 76

Artigo 4 (NOTA CIENTÍFICA)

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. Description of  
reproductive and molt behaviors in *Telonychopus klossae* Hoffman, 1965  
(Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae) ..... 97

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 109

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 110

## I. INTRODUÇÃO GERAL

Os diplópodos possuem sexos separados com os órgãos reprodutores situados entre o tubo digestório e o cordão nervoso central (HOPKIN; READ, 1992), os quais se abrem no terceiro segmento corporal ou logo atrás do segundo par de pernas (BLOWER, 1985).

Diferente de outros Myriapoda, em que o ovário é um órgão tubular simples, os ovários dos milípedes têm sido descritos tanto como uma estrutura simples, como ocorre em algumas espécies da ordem Polyxenida (KUBRAKIEWCZ, 1991b; YAHATA; MAKIOKA 1994), Glomerida (YAHATA; MAKIOKA, 1997), Polydesmida (KUBRAKIEWICZ, 1987), Spirostreptida (NADARAJALINGAM; SUBRAMONIAN, 1984; FREITAS et al., 2003) e Julida (NEWPORT, 1841; KUBRAKIEWICZ, 1991a), quanto estruturas pareadas, encontradas em espécies das ordens Polyxenida, Chordeumatida (FABRE, 1855), Polydesmida (MILEY, 1930; SEIFERT, 1932; ZIRONDI et al., 2012), Spirostreptida (FONTANETTI et al., 2010) e Julida (KUBRAKIEWICZ, 1987). Em outras espécies, como *Anoplodesmus splendidus* (Verhoeff, 1936) (= *Jonespeltis splendidus* Verhoeff, 1936) (Polydesmida, Paradoxosomatidae) (NAIR, 1981), *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Spirobolida, Rhinocricidae) (FONTANETTI; STAURENGO DA CUNHA, 1993) e *Catamicrophyllum caifanum* Verhoeff, 1920 (Julida, Julidae) (WARBURG; GEALEKMAN, 2000), os ovários imaturos são pareados, mas perdem gradualmente sua simetria, tornando-se um saco ímpar que abriga as massas de ovócitos (NAIR, 1981; FONTANETTI; STAURENGO DA CUNHA, 1993) (Tabela 1).

Por um longo período, os ovários dos milípedes foram considerados similares aos de Chelicerata devido ao crescimento dos ovócitos ocorrer projetado externamente à superfície ovariana. Entretanto, estudos desenvolvidos por Makioka (1988) e, posteriormente, confirmado por Fontanetti e Staurengo da Cunha (1993), mostraram que o ovário dos milípedes assemelha-se mais ao ovário panoístico descrito para insetos ortópteros (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998).

Devido a estas várias interpretações, a morfologia ovariana tem sido utilizada na discussão de questões filogenéticas e taxonômicas do grupo, tanto para comparar as espécies das duas subclasses de Diplopoda, Penicillata e Chilognata, quanto para outras classes de Arthropoda (YAHATA; MAKIOKA, 1994; 1997; FREITAS et al., 2003). Os estudos que abordam estes aspectos são os de Kubrakiewicz (1991a) e Yahata e Makioka (1994; 1995; 1997), que determinaram a

presença de zona germinativa simples ou pareada, como sendo uma diferença estrutural fundamental entre as duas subclasses de Diplopoda, em que os penicilatos apresentam germário simples, situado no centro do tecido ovariano, enquanto que nos quilognatos, essas zonas germinativas são pareadas e ocorrem longitudinalmente na lateral do tecido do ovário.

Esses autores indicaram ainda, que nos penicilatos o crescimento dos ovócitos ocorre numa região denominada vitelário, a qual não existe nos quilognatos. Além disso, nos penicilatos os ovócitos presentes no vitelário não tem comunicação com nenhuma região especializada, ou seja, seu crescimento ocorre no lúmen. Já nos quilognatos existe essa comunicação entre os ovócitos em desenvolvimento e as zonas germinativas através dos folículos ovarianos ou suas extensões (YAHATA; MAKIOKA, 1994; 1995; 1997).

No entanto, existem exceções para estes padrões, como é o caso de *Spirostreptus asthenes* Pocock, 1892 (Spirostreptida, Spirostreptidae), que apesar de ser um quilognata, possui um ovário simples tubular com germário terminal, também simples (NADARAJALINGAM; SUBRAMONIAN, 1984). Freitas et al. (2003) observaram em *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 e *P. tricolor* Brölemann, 1901 (Spirostreptida; Pseudonannolenidae), além de um germário terminal simples, a presença de células semelhantes à ovogônias e células em divisão ao longo do ovário, localizadas próximas a membrana externa.

Além das questões taxonômicas e filogenéticas envolvidas no entendimento da estrutura ovariana dos milípedes, os dados referentes a este tema são fundamentais para a compreensão do processo de produção dos ovos nos animais dessa classe (KUBRAKIEWICZ, 1991a, b). No entanto, as informações sobre o desenvolvimento de células germinativas femininas em Diplopoda são bastante escassas, sendo a maioria delas relacionadas a espécies asiáticas (FREITAS et al., 2003). A mesma escassez de informações ocorre tanto para as investigações sobre os componentes químicos dos ovócitos dos diplópodos (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998) quanto para o ciclo ovogenético (WARBURG; GEALEKMAN, 2000).

Com relação aos estudos sobre os componentes químicos dos ovócitos dos diplópodos, pode-se destacar Sharma e Chhotani (1957), que identificaram uma estrutura denominada corpos anelados concêntricos (*concentric ring bodies* – CRBs) no processo de ovogênese de uma espécie do gênero *Thyroglutus* Attems, 1936 (Spirostreptida, Harpagophoridae). Essa mesma estrutura foi encontrada em outra

espécie do gênero *Pleurolooma* Rafinesque, 1820 (Polydesmida, Xystodesmidae) por Crane e Cowden (1968), que verificaram também que os CRBs estão relacionados à reserva de cálcio para a formação do exoesqueleto do embrião. Essa informação foi corroborada por Fontanetti e Camargo-Mathias (2004) que, ao encontrarem CRBs nos ovócitos de *R. padbergi*, discutem a função dessa estrutura e acreditam também que possa ser uma fonte de cálcio para o futuro embrião, uma vez que a disponibilidade deste elemento para os recém emergidos de algumas espécies pode ser muito pequena (FONTANETTI; ZIRONDI, 2000).

Petit (1970) detectou que os componentes dos CRBs são fosfato e carbonato de cálcio associados à uma trama protéica. Sareen e Adiyodi (1983) fizeram uma revisão do sistema reprodutivo de Diplopoda e descreveram alguns componentes químicos dos ovócitos de *A. splendidus* (= *J. splendidus*). Camargo-Mathias et al. (1998) realizaram um estudo histoquímico nos ovócitos de *R. padbergi* e discutiram a origem dos componentes químicos do vitelo, constatando que a composição do mesmo é semelhante à de outros representantes de diversos grupos animais.

Sobre os estudos que abordam o ciclo ovogenético em diplópodos pode-se citar apenas Warburg e Gealekman (2000) com *C. caifanum*, que representa o primeiro acompanhamento quantitativo do ciclo ovogenético de fêmeas de diplópodos. Estes autores quantificaram o número e as dimensões dos ovócitos de *C. caifanum* durante o período de atividade da espécie (outubro a fevereiro), em um bosque de carvalho e uma floresta de pinheiro do norte de Israel. Os resultados foram bastante interessantes demonstrando que a espécie possui um ciclo anual de reprodução, com oviposição ocorrendo durante todo o inverno. Além disso, também observaram que o ovário das fêmeas dessa espécie apresenta ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento, indicando que estes organismos podem produzir várias gerações durante sua vida.

A respeito da dinâmica reprodutiva dos animais desta classe em seu habitat natural, principalmente, para ambientes sazonalmente inundados da região Neotropical, destaca-se apenas a pesquisa de Vohland e Adis (1999) com a espécie amazônica *Pycnotropis tida* (Chamberlin, 1941) (Polydesmida, Aphelidesmidae), a qual apresentou maior número de ovócitos maduros no final da fase aquática (mês de agosto).

Considerando as várias interpretações sobre a morfologia do sistema reprodutor feminino dos diplópodos, a variedade no modo de reprodução desses

animais e a escassez de informações sobre a biologia dos mesmos nos ambientes tropicais, este estudo visou descrever a estrutura ovariana e o ciclo ovogenético de espécies de diplópodos da ordem Polydesmida encontradas em áreas inundáveis e não inundáveis da planície do Pantanal matogrossense. Além disto, esta pesquisa visou fazer um estudo comparativo entre a morfologia ovariana das espécies dessa ordem a fim de contribuir para discussões sobre a evolução morfológica desse sistema nesse grupo.

**Tabela 1** – Lista das espécies com caracterização da morfologia ovariana, em ordem cronológica.

<b>Tipo de ovário</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ordem/Família</b>	<b>Autor/Data</b>
	<i>Julius terrestris</i> Linnaeus, 1758	Julida, Julidae	Newport, 1841
	" <i>Spirostreptus</i> " <i>asthenes</i> Pocock, 1892	Spirostreptida, Spirostreptidae	Nadarajalingam; Subramonian, 1984
	<i>Oxidus gracilis</i> (C.L. Koch, 1847) [= <i>Orthomorpha gracilis</i> (C.L. Koch, 1847)]	Polydesmida, Paradoxomatidae	Kubrakiewicz, 1987
	<i>Ophiulius pilosus</i> (Newport, 1842)	Julida, Julidae	Kubrakiewicz, 1991a
<b>Não pareado</b>	<i>Polyxenus lagurus</i> (Linnaeus, 1758)	Polyxenida, Polyxenidae	Kubrakiewicz, 1991b
	<i>Eudigraphis nigricans</i> (Miyosi, 1947)	Polyxenida, Polyxenidae	Yahata; Makioka, 1994
	<i>Hyleoglomeris japonica</i> Verhoeff, 1936	Glomerida, Doderiidae	Yahata; Makioka, 1997
	<i>Pseudonannolene tocaiensis</i> Fontanetti, 1996	Spirostreptida, Pseudonannolenidae	Freitas et al., 2003
	<i>Pseudonannolene tricolor</i> Brölemann, 1901	Spirostreptida, Pseudonannolenidae	Freitas et al., 2003
	<i>Polyxenus</i> sp. Latreille, 1803	Polyxenida, Polyxenidae	Fabre, 1855
	<i>Craspedosoma</i> sp. Leach, 1814	Chordeumatida, Craspedosomatidae	Fabre, 1855
	<i>Euryurus carolinensis</i> (De Saussure, 1859) [= <i>Euryurus erythropygus</i> (Brandt, 1841)]	Polydesmida, Euryuridae	Milley, 1930
<b>Pareado</b>	<i>Strongylosoma pallipes</i> (Olivier, 1792)	Polydesmida, Paradoxomatidae	Seifert, 1932
	<i>Julius scandinavus</i> Latzel, 1884	Julida, Julidae	Kubrakiewicz, 1987
	<i>Urostreptus atrobrunneus</i> Pierozzi & Fontanetti, 2006	Spirostreptida, Spirostreptidae	Fontanetti et al., 2010
	<i>Leptodesmus dentellus</i> Schubart, 1946	Polydesmida, Chelodesmidae	Zirondi et al., 2012
<b>Pareado em fêmeas imaturas e não pareados nas maduras</b>	<i>Anoplodesmus splendidus</i> (Verhoeff, 1936) (= <i>Jonespeltis splendidus</i> Verhoeff, 1936)	Polydesmida, Paradoxosomatidae	Nair, 1981
	<i>Rhinocricus padbergi</i> Verhoeff, 1938	Spirobolida, Rhinocricidae	Fontanetti; Staurengo da Cunha, 1993
	<i>Catamicrophyllum caifanum</i> Verhoeff, 1920	Julida, Julidae	Warburg; Gealekman, 2000



## II. OBJETIVOS

1. Descrever a morfologia do sistema reprodutivo feminino das espécies de Diplopoda da ordem Polydesmida: *Poratia salvator* Golovatch & Sierwald, 2000, *Myrmecodesmus hastatus* (Schubart, 1945) (Pyrgodesmidae) e *Telonychopus klossae* Hoffman, 1965 (Chelodesmidae).
2. Fazer um estudo comparativo da morfologia ovariana dessas espécies, a fim de contribuir com discussões sobre a derivação desse sistema no grupo, comparando-as com dados de espécies de outras ordens, constantes na literatura.
3. Descrever e comparar a dinâmica da ovogênese nas espécies em estudo, principalmente, no que se refere ao processo de vitelogênese.
4. Descrever o ciclo ovogenético de *P. salvator* e *M. hastatus* que ocorrem no Pantanal matogrossense por meio da estimativa do número dos ovócitos nos ovários de fêmeas adultas caracterizando o ciclo reprodutivo das mesmas, durante os quatro períodos sazonais característicos da região.
5. Verificar a relação da variação hídrica sazonal com o desenvolvimento dos ovócitos dessas espécies no referido ambiente, a fim de discutir possíveis adaptações reprodutivas às inundações periódicas que ocorrem no Pantanal de Mato Grosso.
6. Descrever os comportamentos reprodutivos e de muda de *T. klossae*, a fim de contribuir com o conhecimento sobre a biologia de espécies brasileiras de diplópodos.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

Os Diplopoda ou milípedes, vulgarmente conhecidos como piolhos-de-cobra, emboá, congoró ou gongolo, compreendem, provavelmente, cerca de 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002), porém as estimativas evidenciam que apenas 15% destas estão descritas (ADIS; HARVEY, 2000). Esta classe representa não somente uma das maiores dentre os Myriapoda, mas também de todo Reino Animal, constituindo, aparentemente, o terceiro grande grupo dos Arthropoda terrestre, seguindo Insecta e Arachnida (GOLOVATCH et al., 1995; HOFFMAN et al., 1996).

Possuem distribuição cosmopolita, no entanto, a maior riqueza taxonômica e diversidade ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, devido à afinidade desses animais com os ambientes úmidos (GOLOVATCH, 2009), ao passo que habitats extremos, como desertos e tundras, são destituídos ou marginalmente povoados por espécies deste grupo (HOFFMAN et al., 1996). A dispersão dos diplópodos está limitada ao alto grau de especiação dos indivíduos, e por este motivo, várias espécies são, ainda, endêmicas para ambientes peculiares, tais como cavernas, ilhas e algumas cadeias de montanhas das regiões temperadas (HOPKIN; READ, 1992; MINELLI; GOLOVATCH, 2001).

Alguns países da Europa, América do Norte e Central, incluindo o Caribe, possuem uma lista de espécies atualizada para a fauna de milípedes. A fauna australiana, por sua vez, é avaliada superficialmente em níveis de família e ordem, e as do continente asiático e da região tropical em nível de gênero e/ou espécie (MINELLI; GOLOVATCH, 2001). A fauna Neotropical, segundo Hoffman et al. (2002), está representada por cerca de 1.200 espécies/subespécies, distribuídas em mais de 800 gêneros, 47 famílias e 13 ordens.

Para o Brasil são registradas 20 famílias de diplópodos, com grande número de endemismo para o Brasil Central (SCHUBART, 1950; GOLOVATCH, 1992; HOFFMAN et al., 1996). Na Amazônia foi relatada a ocorrência de 250 espécies (ADIS; HARVEY, 2000; ADIS et al., 2002), sendo descritas somente para a região de Manaus cerca de 112 espécies (GOLOVATCH et al., 2005). A estimativa para este bioma é que este número atinja entre 5.000 e 7.000 espécies (ADIS; HARVEY, 2000; ADIS et al., 2002).

A fauna de diplópodos do Mato Grosso parece ser rica e diversificada, porém está representada, principalmente, por grupos formados por espécies de tamanho corporal grande, como Chelodesmidae e Spirostreptidae. Apenas quatro espécies de

porte pequeno (<10 mm), um Polyxenida e três Pyrgodesmidae, foram encontradas neste ambiente. Esta situação difere marcadamente daquela observada na Amazônia, que suporta uma fauna muito mais rica e representada, em sua maioria, por espécies pequenas dos grupos Pyrgodesmidae e Fuhrmannodesmidae. No entanto, a fauna do Pantanal é pouco investigada e inúmeras identificações estão incompletas ou dúbias, e sem dúvida muito mais espécies, inclusive as menores, poderão ser descritas (GOLOVATCH et al., 2005).

Com relação ao estado de conservação dos diplópodos no Brasil, quatro espécies fazem parte da Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Ministério do Meio Ambiente, 2008) na categoria vulnerável, sendo todas registradas para a região sudeste. No entanto, para as demais regiões do país o *status* de conservação dos animais desta Classe não foi definido em virtude da pouca atenção que se dedica ao grupo (BATTIROLA et al., 2009).

Todos os diplópodos restringem-se praticamente aos ambientes terrestres, e grande parte das espécies é encontrada supostamente em qualquer ambiente, principalmente, em serapilheira de florestas, madeira em decomposição, embaixo de troncos de árvores mortas, no solo, escalando árvores ou em cavernas. Vários milípedes podem ocorrer também em esterco, quase todo tipo de restos de plantas, ninhos de formigas, de cupins e pássaros, tocas de minhocas e mamíferos, próximo à água, à beira-mar, em áreas abertas, debaixo de pedras, em construções, entre outros (MINELLI; GOLOVATCH, 2001).

Diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie podem preferir microhabitats distintos, com os jovens geralmente limitando-se à superfície do solo ou na camada de serapilheira, enquanto os adultos caminham sobre a serapilheira ou escalam a vegetação (ADIS et al., 2002).

A grande maioria dos Diplopoda é detritívora, alimentando-se de material vegetal em decomposição, desempenhando, assim, um importante papel na redução da matéria vegetal e formação do solo orgânico (HOPKIN; READ, 1992; HOFFMAN et al., 1996). Portanto, o principal papel destes invertebrados detritívoros refere-se ao aumento da taxa de decomposição da matéria vegetal, influenciando indiretamente no fluxo de nutrientes através do estímulo da atividade microbiológica, a partir da ampliação da área disponível à colonização por bactérias e fungos provocada pela fragmentação da matéria orgânica (HOPKIN; READ, 1992). Além da atuação dos diplópodos como detritivos, a grande diversidade, idade geológica e baixa vagilidade

desses animais os torna importantes indicadores biogeográficos (HOPKIN; READ, 1992).

Para Golovatch et al. (1995), a função destes animais como decompositores primários de restos de plantas mortas é extremamente representativa, frequentemente, comparável à desempenhada pelas minhocas. Milípedes de floresta temperada, cuja densidade populacional no solo excede 1.000 indivíduos por metro quadrado, foram apontados como responsáveis pelo consumo de 10-15% da serapilheira anual (GOLOVATCH; KIME, 2009), e quando as minhocas são escassas, estes podem chegar a consumir 25% da serapilheira anual (BLOWER, 1970; HOPKIN; READ, 1992).

Existem ainda diplópodos que se alimentam de plantas vivas como as briófitas, além de brotos jovens e finas raízes, outros preferem as algas presentes nos troncos das árvores (HOPKIN; READ 1992). Algumas poucas espécies são carnívoras, a exemplo de *Apfelbeckia insculpta* (CL Koch, 1867) (Callipodida: Schizopetalidae) que se alimenta de minhocas (STOEV; ENGHOFF, 2008), ou ingerem animais mortos, outras são coprófagas incluindo na sua alimentação suas próprias fezes (MINELLI; GOLOVATCH, 2001).

Poucas espécies desta classe são consideradas prejudiciais à agricultura podendo destacar *Blaniulus guttulatus* (Fabricius, 1798) (Julida, Blaniulidae) e *Brachydesmus superus* Latzel, 1884 (Polydesmida, Polydesmidae) que, em agregações, mataram mudas de beterraba através da alimentação das raízes jovens (HOPKIN; READ, 1992; MINELLI; GOLOVATCH, 2001). No Brasil este comportamento foi descrito pela primeira vez por Werner (1941) para uma espécie de espirostreptídeo, não identificada, e por Boock e Lordello (1952) para *Pseudonannolene paulista* Brölemann, 1902 que atacaram plantações de batatinha.

O comportamento de explosões populacionais ou ocorrência em massa de milípedes é conhecido há um longo tempo para diferentes espécies por todo o mundo (HOPKIN; READ, 1992; KANIA; TRACZ, 2005). Essas explosões populacionais podem ocorrer como resultado de distúrbios ambientais, mudanças climáticas e uso de pesticidas que eliminam possíveis competidores (BOCCARDO; FERNANDES, 2000; BOCCARDO et al., 2002). O clima, disponibilidade, busca ou competição por alimento e procura de local para postura ou abrigo são fatores que podem explicar o comportamento migratório e um aumento exagerado no número de diplópodos (KANIA; TRACZ, 2005). Para o Brasil esse fenômeno foi recentemente

descrito por Fontanetti et al. (2010) para *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptida, Spirostreptidae), que infestou uma área urbana da cidade de Campinas, estado de São Paulo.

A maioria dos diplópodos revela pequena capacidade compensatória, ou seja, quando expostos a um fator limitante, acabam morrendo, mesmo que os outros fatores ecológicos sejam favoráveis (GOLOVATCH, 1994). Hopkin e Read (1992), consideraram que os fatores ambientais como o clima, altitude e alimentação são os que mais afetam o desenvolvimento dos diplópodos.

Em áreas inundáveis estes organismos desenvolvem estratégias de sobrevivência para poder suportar as alterações cíclicas do regime hídrico. Estudos demonstraram a existência de grupos de milípedes migrantes e não migrantes nestas áreas (ADIS, 1997; ADIS et al., 1996, 2001). O comportamento migratório do solo para troncos e copas das árvores foi observado por Adis et al. (1996), para *Poratia obliterata* (Kraus, 1960) (Polydesmida, Pyrgodesmidae), *Mestosoma hylaeicum* Jeekel, 1963, *Onciurossoma adisi* Golovatch, 1992 (Polydesmida, Paradoxomatidae), *Prostemmiulus adisi* Mauriès, 1984, *P. amazonicus* Mauriès, 1984, *P. wellingtoni* Mauriès, 1984 (Stemmiulida, Stemmiulidae), *Moojenodesmus pumilus* Schubart, 1944, *M. susannae* Golovatch, 1992 e *Cutervosdesmus adisi* Golovatch, 1992 (Polydesmida, Fuhrmannodesmidae), na região amazônica.

Para a região do Pantanal matogrossense a estratégia de sobrevivência de migração vertical para troncos das árvores foi descrita para *Plusioporus salvadorii* Silvestri, 1895 (Spirostreptida, Spirostreptidae) e *Pantanalodesmus marinezae* Hoffman, 2000 (Polydesmida, Chelodesmidae) (ADIS et al., 2001). Recentemente, observou-se que espécies da ordem Polyxenida migram para o tronco e copas das árvores como resposta ao pulso de inundação (BATTIROLA et al., 2009). Estes últimos autores também descreveram uma correlação significativa entre a densidade mensal dos Diplopoda no solo e a média pluviométrica do local, com maior atividade destes animais ocorrendo na estação chuvosa (outubro a dezembro), indicando que a pluviosidade exerce influência na distribuição e ocupação de habitats por estes organismos.

Ainda sobre os milípedes habitantes da Amazônia pode-se destacar *Myrmecodesmus adisi* (Hoffman, 1985) (Polydesmida, Pyrgodesmidae) pela capacidade de sobreviver submersa pelo período de até 11 meses. Tal estratégia é possível devido à camada de secreção hidrofóbica presente na cutícula, que

possibilita a respiração tipo plastrão aos animais dessa espécie (ADIS, 1997; ADIS et al., 1996; GOLOVATCH, 2009).

Além das adaptações comportamentais e fisiológicas dos milípedes para suportar alterações em seus habitats naturais, estes organismos possuem diferentes categorias de ciclo de vida que, associadas à variação no tempo para maturidade, indicam a grande variedade de história de vida encontrada neste grupo (HOPKIN; READ, 1992).

Com relação ao ciclo biológico, algumas espécies de diplópodos de tamanho corporal grande, oriundas de regiões temperadas, possuem períodos de vida bastante longos, entre dois e 11 anos, enquanto que em ambientes tropicais normalmente não ultrapassam dois ou três anos (HOPKIN; READ, 1992; MINELLI; GOLOVATCH, 2001). Segundo Hopkin e Read (1992), em habitats montanhosos o desenvolvimento dos diplópodos normalmente é retardado em, aproximadamente, um ou dois anos.

Porém, algumas espécies de ambientes tropicais de tamanho corporal pequeno vivem menos de um ano, e o seu ciclo de vida leva cerca de cinco meses para se completar. Isto foi verificado em estudos realizados por Adis et al. (2000) e Bergholz (2007) com *P. obliterata* que ocorre em florestas inundáveis da região amazônica, e por Pinheiro et al. (2009; 2011), com *P. salvator* (Polydesmida, Pyrgodesmidae), espécie partenogenética encontrada na região do Pantanal de Mato Grosso.

O desenvolvimento dos diplópodos é anamórfico, com a emergência de larvas sem pernas, as quais passam para o primeiro estágio através de muda, sendo este dotado de poucos segmentos e, usualmente, três pares de pernas. Os segmentos são adicionados em mudas posteriores e, com estes, pernas, glândulas de defesa e ocelos, se as espécies tiverem olhos quando adultas, são acrescentados ao corpo do animal (HOPKIN; READ, 1992). Também são encontrados espécimes com desenvolvimento hemianamórfico, apesar desses serem uma minoria. A adição de segmentos durante o crescimento dos miriápodos é uma característica marcante do grupo, sendo que em várias espécies, o tamanho final é muitas vezes maior que o original (NEWPORT, 1841).

Algumas espécies de diplópodos possuem a maioria de sua população composta por um menor número de machos em relação às fêmeas, ou não há nenhum macho na população. Segundo Enghoff (1994), a reprodução

partenogenética é reconhecida para muitas espécies desse grupo, que a desenvolvem em certos períodos do ano ou em habitats específicos, mas poucos são os estudos que confirmam a partenogênese como obrigatória.

O tipo de partenogênese mais frequente em Diplopoda é a telítoca, em que ocorre o nascimento apenas de fêmeas a partir de mães não fecundadas, podendo haver a presença de até 5% de indivíduos machos sem função na população (ENGHOFF, 1976; PEITSALMI, 1981). A reprodução partenogenética telítoca consiste em uma solução adaptativa geral para padrões de história de vida particulares como, por exemplo: a) baixa vagilidade das espécies deste grupo; b) estabelecimento caracterizado por diferenças marcantes na distribuição geográfica e/ou ecológica do ancestral sexual e descendentes telítocos; e c) distribuição em habitats com baixa diversidade biótica e alta diversidade abiótica, principalmente, temperatura e sazonalidade (JENSEN et al., 2002). Apesar destas limitações, o sucesso da reprodução partenogenética é garantido pela habilidade colonizadora dos animais, conseqüentemente, altas taxas reprodutivas e independência dos machos em ambientes sujeitos a fatores de mortalidade denso-independente (JENSEN et al., 2002).

A ordem Polydesmida, na qual se incluem as espécies aqui estudadas, está representada por aproximadamente 5.480 espécies, 1.437 gêneros e 30 famílias descritas, sendo considerada a maior da classe Diplopoda, correspondendo a mais da metade de todos os gêneros descritos para Diplopoda (MINELLI; GOLOVATCH, 2001; HOFFMAN et al., 2002 ; SHELLEY, 2003). O tamanho dos adultos varia de 2 a 130 mm, muitas famílias apresentam uma grande variedade de cores e formas, a maioria habita a superfície do solo e serapilheira, e poucas são estritamente arborícolas. Muitas espécies possuem um ciclo de vida curto que se completa em um ano. A maioria das espécies possui os segmentos corporais ornamentados com espinhos proeminentes, os quais, frequentemente, são cobertos por uma camada aderente de detritos do solo (HOFFMAN et al., 1996, 2002). Uma característica reprodutiva importante de muitas espécies dessa ordem é a construção de ninhos para a proteção dos ovos, principalmente, contra variações de umidade e de temperatura (BANO; KRISHNAMOORTHY, 1985; VOHLAND; ADIS, 1999; VOIGTLÄNDER, 2000; PINHEIRO et al., 2009).

A família Pyrgodesmidae, na qual são incluídas as duas espécies aqui pesquisadas, *P. salvator* e *M. hastatus*, é, predominantemente, tropical e uma das maiores famílias da Classe Diplopoda, com 173 gêneros designados (GOLOVATCH; SIERWALD, 2000). Segundo Golovatch (1996), somente a região que compreende o sul do Panamá e toda a América do Sul suporta mais de 40 gêneros e cerca de 60 espécies de pìrgodesmídeos, dos quais, mais da metade ocorre no Brasil. Em nosso país, esta família é ricamente representada na região Amazônica (GOLOVATCH, 1999; GOLOVATCH et al. 2005). Os pìrgodesmídeos são animais pequenos, com tamanho em torno de 6 até 10 mm, sendo crípticos em hábitos e coloração (GOLOVATCH; SIERWALD, 2000). O colo é usualmente em forma de leque, lobulado anteriormente e ricamente ornamentado dorsalmente, os tergitos são sempre fortemente inclinados e em geral, conspicuamente tuberculados ou lobulados, muitas vezes cobertos por lama ou pilosidades (GOLOVATCH; SIERWALD, 2000).

Segundo Hoffman et al. (2002), grande parte dos gêneros da família Pyrgodesmidae tem sido nomeada com base em diferenças estruturais insignificantes, sem considerar que muitas espécies-tipo são conhecidas apenas pelas fêmeas, que não possuem o gonopódio, estrutura morfológica definidora da espécie, gerando, portanto, grandes problemas taxonômicos dentro da Classe. Além disso, o pequeno tamanho corporal (menos de 10 mm) e a complexidade da estrutura do gonopódio, aumentam a dificuldade no estudo desse táxon.

O gênero *Poratia* (Cook & Collins, 1895) é composto, em sua maioria, por espécies em que as fêmeas se reproduzem partenogeneticamente (GOLOVATCH; SIERWALD, 2001). Com relação a este tipo de reprodução algumas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de estabelecer quais fatores influenciam este processo, podendo-se citar Witzel et al. (2003) que demonstraram que a partenogênese em indivíduos deste gênero é determinada pela presença de flavobactérias.

*Poratia salvator* foi originalmente descrita para El Salvador e foi considerada por Golovatch et al. (2005) uma espécie introduzida no Brasil. Caracteriza-se por indivíduos de tamanho corporal pequeno, 3,5 mm de comprimento e 0,5 mm de largura, corpo formado por 19 segmentos e coloração amarelo-acastanhado (GOLOVATCH; SIERWALD, 2000). Ocorre o ano todo em floresta inundável de *Vochisia divergens* Pohl. (Vochysiaceae) do Pantanal de Mato Grosso, conhecidas



localmente por cambarazal, utilizando os murundus e os cupinzeiros que não submergem no período de cheia, como refúgio no período de inundação (BATTIROLA et al., 2009). Possui sete estádios de desenvolvimento e seu tipo de reprodução é a partenogênese telítoca, apesar do nascimento de machos ter sido verificado mas em número muito reduzido (1♂:139,8 ♀s). Seu ciclo de vida é bastante curto, com as fêmeas reproduzindo-se continuamente. A longevidade delas é de cerca de cinco meses e a média de juvenis gerada é de 39 indivíduos/fêmea. O número de filhotes por ninho varia de sete a dez e a eclosão ocorre em média após cerca de 10 dias após a oviposição, com os imaturos tornando-se ativos ainda no primeiro estágio de desenvolvimento (PINHEIRO et al., 2009).

O gênero *Myrmecodesmus* Silvestri, 1910 é rico em espécies, com mais de 30 válidas (Hoffman, 1999 apud GOLOVATCH; ADIS, 2004). Constitui um gênero de diplópodos simbiontes, com suas espécies realizando associações com formigas e/ou cupins, ocupando tanto seus ninhos quanto a periferia dos agrupamentos destes insetos e, frequentemente, sendo carregados por estes durante as emigrações da colônia (GOLOVATCH, 2009). Sua distribuição é pan-Neotropical, com a concentração da diversidade de espécies ocorrendo na América Central e Caribe, enquanto que o sul da América do Norte e toda a América do Sul parecem possuir poucas espécies (GOLOVATCH; ADIS, 2004; GOLOVATCH, 2009).

*Myrmecodesmus hastatus*, também objeto deste estudo, possui tamanho corporal diminuto, cerca de 5-6 mm, ocorre em habitats abertos, geralmente, mas nem sempre, em associação com formigas e/ou cupins, sendo considerada simbiote facultativa (GOLOVATCH; ADIS, 2004). Embora ocorra na maior parte da América do Sul, a distribuição dessa espécie por longa distância, como a extensão dos rios Amazonas/Solimões, desde Pucallpa, Departamento de Loreto, Peru até Belém, Brasil, aparentemente, não acompanha a distribuição de seus hospedeiros, mas poderia ser explicada pelo transporte a jusante com detritos flutuantes como mostrado para outras espécies de milípedes (GOLOVATCH, 2009). É uma espécie adaptada às perturbações antrópicas e ambientes artificiais e coloniza, com sucesso, seguindo seu hospedeiro a uma vasta gama de habitats secundários como pastagens, parques, jardins, pomares, plantações e lugares urbanizados (GOLOVATCH; ADIS, 2004).

Aparentemente, essa ampla distribuição de *M. hastatus* pode ser explicada não só pela associação entre a espécie e as formigas e os cupins, mas também por sua tolerância a altos níveis de dessecação, visto que possui um exoesqueleto reforçado (GOLOVATCH; ADIS, 2004). Possui oito estádios de desenvolvimento, se reproduz bissexualmente e constrói ninhos para os ovos e câmaras de mudas com seu excremento (PINHEIRO, obs. pess.).

A família Chelodesmidae também é considerada uma das maiores da Classe com mais de 150 gêneros reconhecidos. Possui atualmente 790 espécies, as quais estão divididas em duas grandes sub-famílias: Chelodesminae, predominantemente Neotropical, e Prepodesminae, que ocorre na África (PENA-BARBOSA, 2011). A maior concentração de abundância ocorre no centro e oeste da África, sudeste do Brasil e nos Andes. Espécies muito pequenas (adultos com menos de 10 mm de comprimento) são encontradas em diferentes partes dos neotrópicos, já as de tamanho corporal maior (próximo dos 120 mm de comprimento) são localizadas em montanhas do sudeste do Brasil. A organização das espécies dentro desta família, principalmente em tribos e subfamílias, é bastante difícil devido à grande variação estrutural que ocorre tanto na forma do corpo, quanto nas características da genitália (HOFFMAN et al., 1996).

O gênero *Telonychopus* Verhoeff, 1951 faz parte da tribo Telonychopodini, que inclui os quelodemídeos de tamanho corporal de cerca de 70 mm, e possui apenas duas espécies descritas, ambas para o estado de Mato Grosso (HOFFMAN, 2000). Essa tribo é bastante heterogênea e é a que mais sofreu alterações taxonômicas dentre todas da família Chelodesmidae (PENA-BARBOSA, 2011); segundo esse autor, após uma série de revisões, foi atribuído a essa tribo sete gêneros. *Telonychopus klossae* é uma espécie que foi descrita em 1965 com o holótipo coletado no município de Santo Antônio do Leverger, estado de Mato Grosso. Os parátipos são provenientes da Chapada dos Guimarães, no mesmo Estado, e desde 1999 já é reconhecida sua ocorrência no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso (HOFFMAN, 2000). Apesar da descrição dessa espécie ter ocorrido há algum tempo, nenhum aspecto da sua biologia foi abordado até o momento.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### IV. 1. Áreas de coleta

As espécies *P. salvator* e *M. hastatus* (Figuras 1A, B) foram coletadas em florestas inundáveis e não inundáveis de uma área pertencente ao Serviço Social do Comércio (SESC), presentes no Parque SESC Baía das Pedras, uma unidade da Estância Ecológica SESC Pantanal, localizada cerca de 40 Km do município de Poconé, na região norte do Pantanal de Mato Grosso (56°25'17,89" W e 16°29'49,46" S). A espécie *T. klossae* (Figura 1C) foi coletada no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, município de Cuiabá, Mato Grosso (15°36'31,31" S, 56°3'49,44" W).

As coletas ocorreram trimestralmente, durante o período de dezembro de 2009 a janeiro de 2012, contemplando dois ciclos de quatro períodos sazonais anuais característicos da região: enchente, cheia, seca e vazante.

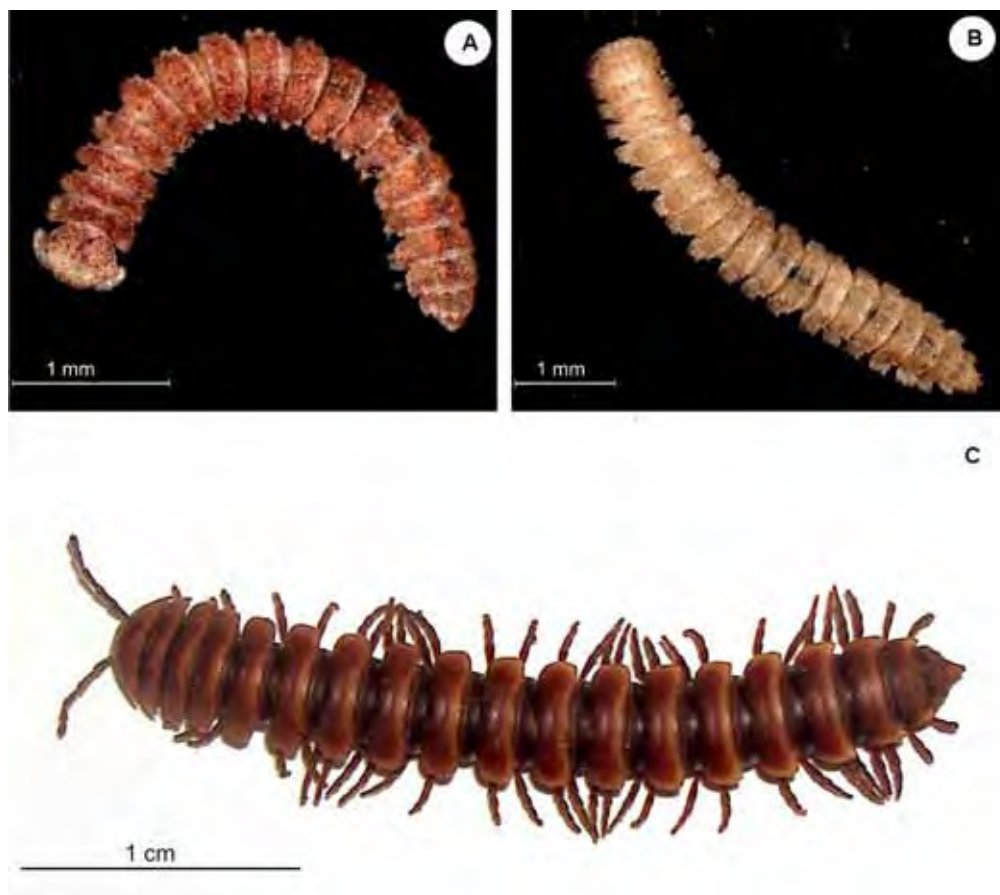
Segundo Heckmann (1998), no Pantanal norte esses quatro períodos sazonais são bem definidos. A enchente ocorre entre os meses de outubro a dezembro e caracteriza-se pela ocorrência de chuvas que podem inundar algumas áreas temporariamente. O período de cheia ocorre entre janeiro e março ou abril, quando a maior parte do Pantanal norte permanece submersa e campos e florestas são inundados pelo transbordamento dos rios e lagos. A vazante, caracterizada pela drenagem rápida das áreas inundadas e redução na quantidade das chuvas, acontece entre abril e junho. A estação seca ocorre entre julho e setembro e é o período no qual a maioria da região está completamente seca e as chuvas são escassas (HECKMANN, 1998).

### IV. 2. Procedimentos em campo

As espécies foram coletadas sob troncos caídos e matéria orgânica em decomposição por meio de busca ativa, por no mínimo três dias, com cerca de quatro horas diárias. Os animais capturados foram mantidos em potes de plástico com tampa, contendo ao fundo uma pequena quantidade de matéria orgânica, identificados, separados por espécie, sexo e tempo de desenvolvimento.

O transporte dos indivíduos foi feito em caixa térmica de poliestireno para o Laboratório de Ecologia e Taxonomia de Artrópodes (LETA), do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá, onde uma parte foi fixada para procedimentos histológicos e histoquímicos, e a outra separada

e transportada viva para análise do ovário ao microscópio eletrônico de varredura. Posteriormente, foram transferidos para o Laboratório de Histologia e de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo.



**Figura 1** – A: *Poratia salvator*; B: *Myrmecodesmus hastatus*; C: *Telonychopus klossae*.

### **IV. 3. Procedimentos em laboratório**

#### **IV. 3. 1. Histologia dos ovários**

As fêmeas de *P. salvator* e *M. hastatus*, por possuírem tamanho corporal diminuto (cerca de 4-6 mm), foram sacrificadas por rápido congelamento (5 minutos) e fixadas inteiras. Para facilitar a penetração do fixador, as extremidades do corpo (cabeça e télson) foram retiradas. Já as fêmeas adultas da espécie *T. klossae*, com tamanho corporal grande (> 5 cm), foram sacrificadas por meio de rápido congelamento e dissecadas em solução fisiológica para retirada do ovário, com auxílio de estereomicroscópio. Todo o material foi preservado em solução de Bouin alcoólico, paraformaldeído e formol cálcio por pelo menos 28 horas.

O material devidamente fixado foi desidratado em série alcoólica por 30 minutos cada concentração (70%, 80%, 90% e 95%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluído em resina contendo catalisador. Após a polimerização, os blocos foram seccionados com espessura de até 5µm com auxílio de micrótomo. Os cortes foram recolhidos em lâminas.

Após secagem das lâminas em estufa, os cortes foram hidratados por 1 minuto em água destilada, corados com hematoxilina de Harris por 7 minutos e após esse processo, reagiram com água de torneira por 4 minutos. Após estas etapas foram lavados em água corrente, corados com eosina por 5 minutos e, novamente, lavados em água corrente. Depois de secas, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. As imagens foram capturadas pelo software Leica IM50 versão 5 Release 220 para o registro dos resultados.

#### **IV. 3. 2. Histoquímica**

As análises histoquímicas dos ovócitos das espécies estudadas foram realizadas para detectar a presença de lipídios, proteínas, polissacarídeos e cálcio. Todo material processado para estudo histoquímico foi analisado em microscópio de luz com as imagens capturadas por programas adequados para este tipo de análise.

##### **IV. 3. 2. 1. Polissacarídeos**

Para detecção de polissacarídeos utilizou-se o material fixado em solução de Bouin por 24 horas e seguiu-se a técnica simultânea de coloração azul de Alcian (para a detecção de polissacarídeos ácidos) com ácido periódico-Schiff (para a identificação de polissacarídeos neutros e glicoconjugados). A técnica consiste na

hidratação dos cortes em água destilada, coloração com azul de Alcian pH=2,5 por 30 minutos, lavagem em água destilada, adição de ácido periódico a 1% por 10 minutos, lavagem em água destilada, reação em reativo de Schiff por 40 minutos no escuro, aplicação de água sulfurosa por 5 minutos, lavagem em água corrente por 5 minutos, secagem e montagem com bálsamo do Canadá.

#### **IV. 3. 2. 2. Proteínas**

As proteínas foram detectadas de acordo com Pearse (1985), utilizando material fixado em paraformaldeído a 4% ou Bouin por aproximadamente 24 horas, coloração com solução de azul de bromofenol por cerca de 2 horas a temperatura ambiente, e lavagem dos cortes com ácido acético a 0,5%. Além desta técnica, empregou-se a proposta de Mello e Vidal (1980), que consiste na coloração em xylidine ponceau, por 40 minutos e diferenciação em tampão acetato pH= 2,5 por, aproximadamente, um minuto.

#### **IV. 3. 2. 3. Lipídios**

Para a identificação dos lipídios aplicou-se a técnica de coloração com azul do Nilo, proposta por Lison (1985). Para isso, o material fixado em formol cálcio foi corado com solução de azul do Nilo a 1%, a 37°C, por 5 minutos, diferenciado em ácido acético a 1% por 1 minuto e a lâmina montada com gelatina glicerinada.

#### **IV. 3. 2. 4. Cálcio**

O cálcio foi investigado seguindo método de von Kossa, descrito por Junqueira e Junqueira (1983). O material fixado em paraformaldeído a 4% ou Bouin por aproximadamente 24 horas, foi mergulhado em nitrato de prata por 20 minutos, lavados com água, mergulhado em fixador F-5 por 5 minutos e os núcleos contra-corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

#### **IV. 3. 3. Ultramorfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV)**

O material foi fixado em solução de glutaraldeído a 2,5 % além da solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 à 4°C por 2 horas. Após este procedimento foram feitas duas lavagens, de 30 minutos cada, com solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2. As amostras foram desidratadas em concentrações graduais de acetona (50%, 75%, 90%, 95%) por 10 minutos cada

concentração, e três banhos de 10 minutos a 100%. Finalizada esta etapa, o material foi colocado em ponto crítico para total dessecação e recoberto em *sputtering*. As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura, de bancada, baixo vácuo, TM-3000 Hitachi High Technologies.

#### IV. 4. Análises dos dados do ciclo ovogenético

Os ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento de cada fêmea foram contabilizados. Assumiu-se para os cálculos, o maior valor obtido para cada estágio. Os dados foram analisados com o programa estatístico Systat 11, assumindo o nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ). Como a amostra de dados não apresentou distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças no número médio de ovócitos em cada estágio de desenvolvimento, entre os quatro períodos sazonais. O teste *a posteriori* empregado foi o Kolmogorov-Smirnov.

A frequência relativa foi calculada para os ovócitos em estágio III para verificar qual período sazonal apresentou um maior número de fêmeas com ovócitos vitelogênicos, caracterizando o período reprodutivo. Além disso, foi feito um teste de correlação para verificar a relação entre o número de ovócitos e a pluviosidade média.

Para verificar a distribuição dos ovócitos vitelogênicos entre os períodos sazonais, agrupou-se o número dos ovócitos de cada período em cinco intervalos (classes de número) que contemplaram os valores mínimos e máximos contabilizados.

Os dados sobre pluviosidade foram fornecidos pelas Plataformas de Coleta de Dados (PCD), sob a responsabilidade do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Centro Regional do Nordeste/Sistema Nacional de Dados Ambientais (INPE/CRN/SINDA), e correspondeu à Estação de Porto Cercado, Pantanal de Mato Grosso, o ponto mais próximo da área de coleta. Os registros da pluviosidade ocorreram diariamente com leituras realizadas em intervalos de uma hora, totalizando 24 registros/dia.

Para o cálculo da pluviosidade média agrupou-se todos os dados referentes aos meses correspondentes a cada período sazonal dos anos de coleta: i) período de chuva: correspondeu aos dados de outubro a dezembro de 2009, 2010 e 2011; ii) período de cheia: dados dos meses de janeiro a março de 2010 e 2011 e janeiro

de 2012; iii) vazante: informações de abril a junho de 2010 e 2011; e iv) seca: dados de julho a setembro de 2010 e 2011. Os dias ou horários que não apresentaram registro da pluviosidade foram excluídos dos cálculos.



## V. RESULTADOS

Os resultados obtidos com o presente trabalho possibilitaram a elaboração de três artigos e uma nota científica que foram submetidos para revistas especializadas conforme relação abaixo:

### Artigo 1

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. **Ovarian morphology and oocyte development in three species of polydesmids diplopods.** *Animal Biology. Submetido.*

### Artigo 2

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. **Comparative study of the ovarian morphology in the order Polydesmida (Diplopoda) and description of unusual structures in the female reproductive system.** *Brazilian Journal of Biology. Submetido.*

### Artigo 3

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; BATTIROLA, L. D.; FONTANETTI, C. S. **Oogenetic cycle and reproductive strategies in two species of millipede (Diplopoda) from Pantanal of Brazil.** *Zoologia. Em preparação.*

### Artigo 4 (NOTA CIENTÍFICA)

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; FONTANETTI, C. S. **Description of reproductive and molt behaviors in *Telonychopus klossae* Hoffman, 1965 (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae).** *Em preparação.*

**Ovarian morphology and oocyte development in three species  
of polydesmids diplopods**

Tamaris Gimenez Pinheiro<sup>1</sup>; Marinêz Isaac Marques<sup>2</sup> and Carmem Silvia Fontanetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil, 13506-900.

<sup>2</sup>UFMT (Universidade Federal de Mato Grosso), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Instituto de Biociências, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, 78060-900.

**Running title:** Ovarian morphology and oogenesis in diplopods

\*Corresponding author: Carmem Silvia Fontanetti. UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia. Rio Claro, SP, Brazil, CEP 13506-900. Telephone: 55 19 3526 4139. Email: fontanet@rc.unesp.br.

**KEYWORDS:** histochemical analysis; Neotropical millipedes; oogenesis; vitellogenesis.

### **ABSTRACT**

This paper shows a comparative study of the ovarian structure and the oocyte development of three species of diplopods in the order Polydesmida: *Poratia salvator*, *Myrmecodesmus hastatus* and *Telonychopus klossae*. The aim of this work was also identify the compounds of the oocytes of these species in order to provide information that will support discussions on the formation and development of these cells. The specimens were collected between December 2009 and December 2010 in the region of the Pantanal of Poconé and the city of Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. The ovaries of adult females were processed for histological and histochemical studies. In *P. salvator* and *M. hastatus* the ovary appeared as an unpaired structure without regionalisation of oogenetic development. In *T. klossae* the ovary appeared as a paired structure containing oocytes clustered in ovisacs joined by a slender membrane. The oocytes were present in three stages of development (I, II and III), which were distinguished by size, the aspect of the ooplasm and the deposition of the chorion. With regard to the components of the oocytes, the deposition of lipids was noticed first, followed by the deposition of proteins, carbohydrates and calcium. These elements are derived from both endogenous and exogenous sources.

**PALAVRAS-CHAVE:** análises histoquímicas; milípedes neotropicais; ovogênese; vitelogênese

## **RESUMO**

Este artigo traz um estudo comparativo da estrutura do ovário e do desenvolvimento ovogênico de três espécies de diplópodos da ordem Polydesmida: *Poratia salvator*, *Myrmecodesmus hastatus* e *Telonychopus klossae*. Foi objetivo deste trabalho também, identificar os compostos dos ovócitos destas espécies, a fim de proporcionar informações que irão apoiar as discussões sobre a formação e desenvolvimento destas células. Os espécimes foram coletados entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010 na região do Pantanal de Poconé e na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Os ovários das fêmeas adultas foram processados para estudos histológicos e histoquímicos. Em *P. salvator* e *M. hastatus* o ovário apareceu como uma estrutura não pareada, sem regionalização do desenvolvimento ovogênico. Em *T. klossae* o ovário se apresentou como uma estrutura pareada, contendo ovócitos agrupados em ovissacos, unidos por uma membrana delgada. Os ovócitos apresentaram três estágios de desenvolvimento (I, II e III), que foram diferenciados pelo tamanho, aspecto do ovoplasma e deposição do cório. Com relação aos componentes dos ovócitos, a deposição de lípidos foi notada em primeiro lugar, seguida pela deposição de proteínas, carboidratos e de cálcio. Estes elementos são derivados tanto de fontes endógenas, quanto exógenas.

## INTRODUCTION

The number of studies related to the ovarian morphology of Diplopoda is limited and the vast majority of these studies contain a basic and fragmented description. Examples can be found in the studies of Newport (1841), Fabre (1855), Miley (1930), Seifert (1932), Sareen (1967), Crane and Cowden (1968), Nair (1981), Sareen and Adiyodi (1983), Nadarajalingam and Subramonian (1984), Biswas et al. (1987), Kubrakiewicz (1987; 1989; 1991a, b), Fontanetti and Staurengo da Cunha (1993), Yahata and Makioka (1994; 1997), Gealekman et al. (1996), Warburg et al. (1998), Warburg and Gealekman (2000), Freitas et al. (2003) and Fontanetti et al. (2010).

The same lack of information occurs into the compounds of the diplopod oocytes, can highlighted the studies of Sharma and Chhotani (1957), Crane and Cowden (1968), Petit (1970), Kubrakiewicz (1989), Camargo-Mathias et al. (1998) and Fontanetti and Camargo-Mathias (2004); these authors identified the presence of calcium in structures called concentric ring bodies (CRBs) in the oogenesis process of some species of diplopods; Nair (1981) investigated vitellogenesis in *Anoplodesmus splendidus* (Verhoeff, 1936) (incorrectly referred to as *Jonespeltis splendidus*) (Polydesmida, Paradoxosomatidae); Nadarajalingam and Subramoniam (1984) conducted a comparative eletrophoretic study between the compounds of the oocytes, haemolymph and fat body of "*Spirostreptus*" *asthenes* Pocock, 1892 (Spirostreptida, Harpagophoridae); Camargo-Mathias et al. (1998) carried out a histochemical study of the oocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Spirobolida; Rhinocricidae) and discussed the origin of the compounds of the vitellus; and Fontanetti et al. (2010) studied the dynamics of the oogenesis of *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptida; Spirostreptidae).

Knowledge of the morphological, structural and functional interrelationships that exist between somatic cells and germ cells in the gonads is of fundamental importance for studying the biology of gametes, reproduction and embryonic development in animals (Kubrakiewicz, 1991b). Therefore, the objective of this study was to conduct a comparative analysis of the ovarian structure, oocyte development and identify the compounds of the oocytes in three species of Neotropical diplopods of the order Polydesmida: *Poratia salvator* Golovatch & Sierwald, 2000, *Myrmecodesmus hastatus* (Schubart, 1945) (both Pyrgodesmidae) and

*Telonychopus klossae* Hoffman, 1965 (Chelodesmidae). Furthermore, it is intended provide information that will support discussions on the formation and development of these cells in the group.

## MATERIAL AND METHODS

The species *P. salvator* and *M. hastatus* were collected in the North region of the Pantanal of Mato Grosso, in an area located around 40 Km from the city of Poconé, Mato Grosso, Brazil. The species *T. klossae* was collected in the city of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. The samples lasted for at least five hours daily and occurred every trimester between December 2009 and January 2011. Collections were made by active search when individuals were sought in litter and under logs or any materials that were in direct contact with the soil.

As the adult females of *P. salvator* and *M. hastatus* have a small body size (approximately 4 mm), they were sacrificed by fast freezing and then fixed entirely, except for the body extremities (head and telson), which were removed. The adult females of *T. klossae*, which possess a large body size (> 5 cm), were also sacrificed by fast freezing; however, they were dissected in physiological solution to remove the ovary. The fixatives used were alcoholic Bouin solution and formol calcium, and specimens were fixed for at least 28 hours.

The fixed material was dehydrated in a series of ethanol solutions at 70%, 80%, 90% and 95%. After 30 minutes of incubation in each concentration of ethanol solution, specimens were placed in embedding resin for at least 24 hours and then finally placed in resin containing catalyser. After polymerisation, the blocks were sectioned with a microtome at a thickness that did not exceed 6 µm.

The sections were hydrated, collected on microscope slides, and stained with haematoxylin and eosin, according to the histological procedure and submitted to the histochemical tests to detect of total proteins using the techniques of xylydine ponceau (Mello and Vidal 1980) and bromophenol blue (Pearse 1985), polysaccharides by the simultaneous technique of Alcian blue/PAS (Junqueira and Junqueira 1983), calcium by the von Kossa method (Junqueira and Junqueira 1983) and acid lipids by the Nile blue technique (Lison 1985).

The slides were analysed under a light microscope and the images were captured using Leica IM50 software, version 5 Release 220, in order to record the results. The thickness of the chorion was measured using the software tpsDig,

version 2.16. In order to calculate the mean thickness, ten measurements of 28 cells per species were made.

Oocyte development was assessed using the classification proposal by Camargo-Mathias et al. (1998). However the designation type I, II and III used by these authors was modified by stage I, II and III.

## RESULTS

### *Poratia salvator*

The ovaries of the individuals of *P. salvator* consist of an unpaired structure that is distributed on the midline along the longitudinal axis of the animal (Fig. 1A, 2A), surrounded by an external membrane that separates it from the perivisceral fat body (Fig. 2B).

Differences in cell size, the homogeneity of the cytoplasm and the development of the chorion enabled the identification of three stages of oocyte development (Fig. 2C). Stage I is characterised by reduced cell size, homogeneous cytoplasm of a basophil nature, a prominent germ vesicle and nucleolus and the absence of the chorion (Fig. 2C, D). Stage II is characterised by a larger cell size than stage I, less basophil-like cytoplasm than stage I and fine granulation due to the onset of vitellogenesis (Fig. 2C, D). In some cases, the germ vesicle and nucleolus could be visualised (Fig. 2C); during this stage the deposition of the chorion begins. Stage III is characterised by a large cell size and heterogeneous ooplasm filled with varying sizes of granules of the vitellus. In stage III, vitellogenesis is concluded, and the chorion is already fully deposited (Fig. 2B, C, D). The chorion of this species is very slender, with a mean thickness of 1.14  $\mu\text{m}$  (minimum=0.66  $\mu\text{m}$ ; maximum=1.69  $\mu\text{m}$ ).

The development of the oocytes of this species is not regionalised within the reproductive organ, and cells in various stages of development are found throughout the ovary. The follicular epithelium is poorly developed; the follicular cells were mainly visualised around the oocytes at stages I and II and were greatly reduced in number (Fig. 2D). The follicular cells were difficult to observe in oocytes at stage III, due to increased size of these reproductive cells.

With regard to the compounds of the *P. salvator* oocytes, polysaccharides, proteins, lipids and calcium were detected (Table 1). Neutral polysaccharides were strongly positive in the oocytes at stage III. These polysaccharides were present both

as large granules in the central region of the cells and as small granules in the periphery of the cells (Fig. 2E). In stage II oocytes, neutral polysaccharides were observed with fine granulation; however, very few acid polysaccharides were identified (Fig. 2F). The oocytes at stage I were weakly positive (Fig. 2F). Although the chorion in the stage III oocytes of this species is extremely slender, positivity for neutral polysaccharides could be detected (Fig. 2E).

The histochemical assays that were carried out to detect proteins indicated that oocytes of all development stages are highly positive for proteins (Fig. 3A). The oocytes at stage III possessed small granules that were distributed in the cell periphery and larger granules that were located in the central region of the oocytes (Fig. 3B). The nucleolus was very evident in the oocytes at stage I, showing high protein activity (Fig. 3A, C). The chorion in stage III was strongly positive for proteins (Fig. 3B, C).

Acid lipids were strongly evidenced in the oocytes of *P. salvator* (Fig. 3D). Large amounts of calcium were detected in the oocytes at stage II (Fig. 3E) and appeared in the form of very small granules that were distributed in one of three ways within the cytoplasm: a) uniformly; b) only in the periphery; or c) aggregated only in a portion of the oocyte. In the oocytes at stage III, calcium was observed as small granules distributed throughout the cytoplasm (Fig. 3F).

The external membrane of the ovary was moderately positive for polysaccharides (Fig. 2F) and proteins (Fig. 3A). The perivisceral fat body of *P. salvator*, which exists in close contact with the gonad, contained granules that were positive for neutral polysaccharides (Fig. 2F), moderately positive for proteins (Fig. 3A, C), strongly positive for acid lipids (Fig. 3D) and weakly positive for calcium (Fig. 3F).

### ***Myrmecodesmus hastatus***

Similar to *P. salvator*, the ovary of *M. hastatus* is distributed in the middle portion of the longitudinal axis of the animal body and does not exist in a configuration that indicates pairing; thus, it can be classified as unpaired (Fig. 1A, 4A). The ovary is also involved by an external membrane that separates it from the perivisceral fat body (Fig. 4A), which is well-developed around the gonad.

Oocyte development was observed in three stages (Fig. 4B, C, D, E), as it occurs in *P. salvator*. However, the chorion (Fig. 4B) present in the oocytes at stage



III is approximately 1.24 times thicker than that observed in *P. salvator* (mean= 1.41  $\mu\text{m}$  thickness; minimum=1.05  $\mu\text{m}$ ; maximum=2.26  $\mu\text{m}$ ).

Cells in the three stages of development were found throughout the ovary of the species, indicating that there was no regionalisation in their development (Fig. 4C). Follicular cells were more rare in *M. hastatus* than in *P. salvator* and were difficult to visualise (Fig. 4B).

Polysaccharides, proteins, lipids and calcium were the constituents of the oocytes of *M. hastatus* (Table 1). The oocytes at stage III were strongly positive for neutral polysaccharides, which predominantly exist as large granules distributed throughout the cytoplasm (Fig. 4C, D). The oocytes at stage II possessed smaller granules that reacted strongly in the test for the detection of neutral polysaccharides (Fig. 4C, D, E). Oocytes at stage I were weakly positive for polysaccharides (Fig. 4C, D, E). Although the chorion of the oocytes at stage III of this species is not well developed, it exhibited positivity for neutral polysaccharides (Fig. 4B).

Proteins were detected in oocytes at all stages of development (Fig. 5A, B) as well as the chorion (Fig. 5A). Oocytes of all three stages also exhibited strong positivity for acid lipids (Fig. 5C, D). The oocytes at stage II exhibited a high concentration of calcium, whereas the oocytes at stage I were only weakly positive for calcium (Fig. 5E).

The external membrane was weakly positive for neutral polysaccharides (Fig. 4E) and strongly positive for proteins (Fig. 5B). The fat body contains granules that are strongly positive for proteins (Fig. 5B).

### ***Telonychopus klossae***

The species *T. klossae* possesses a paired ovary containing oocytes that are grouped in ovisacs, which are delimited by a slender external membrane (Fig. 1B, 6A). These ovisacs contain oocytes at all stages of development (Fig. 6A). The ovisacs open into a single oviduct that bifurcates into the opening of the vulva.

*Telonychopus klossae* also exhibited three stages of oocyte development (Fig. 6A, B), as was observed in the other two species studied. However, the chorion in the oocytes at stage III is very thick (Fig. 6B, C, D) (mean= 7.99  $\mu\text{m}$ ; minimum=4.72  $\mu\text{m}$ ; maximum=11.43  $\mu\text{m}$ ), approximately 7.04 and 5.67 times thicker than *P. salvator* and *M. hastatus*, respectively. The follicular epithelium is also more developed in this

species, possessing a conspicuous layer of follicular cells, even in stage III oocytes, which contain follicular cells that appear flatter and scattered due to the increased volume of the oocyte during this stage (Fig. 6B, C, D).

The results of the histochemical tests also indicated that polysaccharides, proteins, lipids and calcium were present in the oocytes of *T. klossae* (Table 1). The oocytes at stages I and II were weakly positive for polysaccharides (Fig. 6E), whereas oocytes at stage III, which possessed large granules, were strongly positive for polysaccharides in both the central region and the chorion (Fig. 6F).

The oocytes were positive for proteins in all stages of development (Fig. 7A, B). Regarding lipids, the oocytes at stages II and III contained granules of the vitellus and chorion that were moderately positive for lipids (Fig. 7C, D), whereas the oocytes at stage I were strongly positive (Fig. 7C, D) for this compounds. Calcium was detected at high concentration in oocyte at stages II and III (Fig. 7E, F).

## DISCUSSION

### Ovarian morphology

The examination of the ovarian morphology of three species of Polydesmida reinforces the idea that the morphology of this organ in Diplopoda differs from that of Chelicerata as it was believed for a long time (Fontanetti and Staurengo da Cunha 1993; Camargo-Mathias et al. 1998). Contrary to Chelicerata, the development of the oocytes in Diplopoda does not occur outside the ovary wall, but rather along the lumen, as it occurs in centipedes (King 1925; Herbaut and Joly 1972; Makioka 1988). Moreover, according to the classification suggested by Fontanetti and Staurengo da Cunha (1993) and Camargo-Mathias et al. (1998), the ovaries of *P. salvator*, *M. hastatus* and *T. klossae* are of the panoistic type because they do not contain nurse cells.

Although the three species studied belong to the same order, differences were observed in the configuration of the mature ovary in each species. Adult females of *P. salvator* and *M. hastatus* possess ovaries that consist of an unpaired tubular structure, which was described to some diplopods adult females of the order Spirostreptida (Nadarajalingam and Subramonian 1984; Freitas et al. 2003), Julida (Newport 1841; Kubrakiewicz 1991a), Polyxenida (Kubrakiewicz 1991b; Yahata and Makioka 1994) and Glomerida (Yahata and Makioka 1997). However, the mature ovary of *T. klossae* appears to be a paired structure in which the oocytes are

grouped in ovisacs. The pairing of the adult female reproductive organ was observed in other species within the order Polydesmida (Miley 1930; Seifert 1932), as well as in a species of Spirostreptida (Fontanetti et al. 2010).

The oocyte development of the species studied herein did not appear regionalised, i.e., the oocytes were randomly distributed throughout the ovary and therefore lacked distinct areas containing the different stages of vitellogenesis. This information corroborates the findings made by Kubrakiewicz (1987) for *Julus scandinavus* Latzel, 1884 (Julida; Julidae), by Freitas et al. (2003) for the species of the genus *Pseudonannolene* Silvestri, 1895 (Spirostreptida; Pseudonannolenidae) and by Fontanetti et al. (2010) for *U. atrobrunneus* (Spirostreptida; Spirostreptidae).

These results differ from those reported by Nair (1981), which described four stages of vitellogenesis in *J. splendidus*: two pre-vitellogenic stages and two vitellogenic stages. In addition to this report by Nair (1981), Nadarajalingam and Subramonian (1984) divided the tubular ovary of *S. asthenes* into three zones in which progressive oocyte growth, differentiation and vitellogenesis occur: the apical or germinative zone, the medium or pre-vitellogenic zone and the anterior or vitellogenic zone. Yahata and Makioka (1994) observed a germarium in *Eudigraphis nigricans* (Miyosi, 1947) (Polyxenida; Polyxenidae), which contains oogonia, pre-vitellogenic oocytes and a vitellarium comprised of more developed oocytes.

Regarding the germarium, no region was observed in the mature ovaries of the species studied that could be responsible for oogonial development. This has also been observed in Chelicerata such as *Limulus polyphemus* Linnaeus, 1758 (Xiphosura; Limulidae) (Munson 1898; Gardiner 1927; Makioka and Saito 1984 apud Makioka 1988) and *Liocheles australasiae* (Fabricius, 1775) (Scorpiones; Ischnuridae) (Makioka and Koike, 1979 apud Makioka 1988), indicating that these species' germ cells were formed during the immature stages of development and that only cell differentiation and maturation occur during the adult phase of development, not production of new oogonia.

For the species studied, the absence of a germarium in the mature ovary can be explained by the short life histories of *P. salvator* (Pinheiro et al. 2009) and *M. hastatus* (Pinheiro, pers. comm.), which live about three months, and by the possibility of a specific reproductive period that coincides with the rainy season in the region of Pantanal (Battirola et al. 2009). These factors may stimulate the formation of all the germ cells before the females reach the reproductive age in order to ensure

greater reproductive success. Further studies on the immature stadiums of the females will be required to confirm this information.

### **Oocyte development**

The three stages of oocyte development observed in the current study were also described for other species (Camargo-Mathias et al. 1998; Fontanetti et al. 2010). Ramamurty (1968) stated that the compounds of the insect vitellus can exist as a free form or chemically bound to other elements. The results obtained in this study indicate that the complex constitution of the vitellus also exists in the species of diplopods surveyed in this study; several components of the vitellus did not stain or react, regardless of the techniques used or tests applied. This same author also suggested that the components of the vitellus are generally deposited in the oocyte in the following sequence: lipids, proteins and carbohydrates. The results found in the present study confirm this sequence because the lipids were strongly detected in the less developed oocytes of each species studied.

In a study conducted by Camargo-Mathias et al. (1998) on *R. padbergi*, this order of deposition is not maintained; the lipids were detected in the oocytes during the second stage of development, after proteins and carbohydrates, which were identified in the oocytes in the first stage. The oocytes of *U. atrobrunneus* exhibit another deposition order for the compounds: carbohydrates are deposited first, then proteins and finally lipids, which are present in small quantities (Fontanetti et al. 2010). In *A. splendidus*, Nair (1981) observed that the sequence of deposition was carbohydrate, lipid and protein. From these observations, it could be inferred that the order of deposition of these elements does not follow a pattern; however, the order may depend on the specific requirements of each species.

Several authors believe that the oocytes of diplopods are able to intrinsically synthesise the majority of their compounds without the support of the follicular cells (autosynthesis), which, when present, do not exhibit any alterations during vitellogenesis or the production of the chorion (Crane and Cowden 1968; Nair 1981; Kubrakiewicz 1991a). However, studies such as those of Nadarajalingam and Subramonian (1984), Kubrakiewicz (1991b), Camargo-Mathias et al. (1998) and Fontanetti et al. (2010) have suggested both endogenous and exogenous sources (auto-heterosynthesis) for the compounds of the diplopods oocytes. The main exogenous sources are proposed to be the follicular cells and the fat body. Some

studies have also shown that follicular cells can produce substances that form complexes with proteins of the haemolymph, thereby facilitating the transport of the substances into the oocyte and providing an external source of the compounds (Anderson and Telfer 1970; Bast and Telfer 1976; Fontanetti et al. 2010).

The involvement of follicular cells and the fat body in providing exogenous sources of polysaccharides and proteins in the species *P. salvator* and *M. hastatus* is unlikely. Two hypothesis can be proposed to explain this claim: a) follicular cells are rarely observed in proximity to the oocytes during development stages and do not exhibit morphological alterations during vitellogenesis, indicating little activity; and b) both polysaccharides and proteins are deposited after the formation of the chorion, which would hinder the penetration of these compounds. For *T. klossae*, the participation of these two structures could occur because both the follicular epithelium and the fat body are more developed in this species and are found in close contact with the oocytes during all the stages of development; however, the chorion of the oocytes in stages II and III are very thick and likely prevent the entrance of proteins and polysaccharides. Thus, it can be suggested that the polysaccharides and proteins are only produced endogenously by the oocytes.

Regarding to lipids, as these compounds are the first to be deposited in the oocytes of the species studied can not be ruled out the participation of an extra-ovarian source. In this case, the follicular cells and fat body could be potential sources.

Because the nucleolus is generally well developed in Diplopoda, the endogenous origin of the proteins is closely associated with the germ vesicle, suggesting an intense amplification of ribosome genes during oogenesis (Cave 1982; Fontanetti and Staurengo da Cunha 1993; Fontanetti et al. 2010). The results found in the present study corroborate this information because the three species studied have well-developed nucleoli. Furthermore, it can be proposed that the formation of granules of vitellus in stage III oocytes begins with the fusion of smaller granules that are present in stage II, as described in *R. padbergi* by Camargo-Mathias et al. (1998).

In regard to calcium, Petit (1970) considered the occurrence of concretions in the oocytes of *Polydesmus complanatus* (Linnaeus, 1761) (Polydesmida, Polydesmidae) coincident with the presence of globules of lipids, suggesting that calcium deposition occurs before the proteinaceous vitellogenesis. This information

was confirmed in the present study, since the stage I oocytes of the species studied reacted positively to the calcium detection test. Camargo-Mathias et al. (1998) verified that although calcium also appears before vitellogenesis in *R. padbergi*, in the less developed oocytes containing homogeneous cytoplasm, calcium is not associated with lipids because lipids were only observed in the second stage.

The oocytes of the species studied exhibited high concentrations of calcium, which does not form complexes with the components of the granules of vitellus, as observed in *R. padbergi* by Camargo-Mathias et al. (1998) and Fontanetti and Camargo-Mathias (2004). The function of these mineralised components in millipedes is highly debatable. Kubrakiewicz (1989) believes that these structures represent a mechanism for mineral detoxification because these organisms are constantly exposed to high concentrations of minerals in the soil. Crane and Cowden (1968) and Petit (1970) suggested that the accumulation of calcium salts provides a particular type of calcium reserve to be used in the calcification of the exoskeleton of the embryo, which is supported by the observation that the influx of calcium at the beginning of the juvenile stadiums is small in some species (Fontanetti and Zirondi 2000).

In the case of the species studied herein, the second hypothesis is more likely because the juveniles are extremely active when they emerge (Pinheiro et al. 2009; Pinheiro, pers. comm.), indicating that the exoskeleton offers protection against desiccation and predators during the first stadium of development. Moreover, the idea of detoxification proposed by Kubrakiewicz (1989) seems impractical because the oocyte is a cell that is highly specialised for reproduction and is unlikely to possess a secondary function, as proposed by this author (Fontanetti and Camargo-Mathias 2004).

The presence of a thinner chorion in *P. salvator* can explain the behaviour of juveniles, which leave the nest to feed immediately after emerging, even in the first stadium of development (Pinheiro et al. 2009). This behaviour is uncommon for most diplopods, which remain inactive in the nest until they reach the third stadium, surviving on nutrients provided by the capsule of the egg, as proposed by Hopkin and Read (1992).

The results obtained in this study demonstrate the existence of a variety of conformations of the mature female reproductive apparatus in Diplopoda, which can present: i) presence or absence of the oogonial proliferative zone; ii) difference in the

position of this structure; iii) pairing or not of the germarium and ovary as a whole; and iii) grouping or not of the oocytes in ovisacs. It was also noticed that the species studied presented particularities that can be related with the histories of life and behavior.

The establishment of a common ovary configuration and its phylogenetic relationships seems premature given that the information on the ovarian morphology of millipedes is derived from only a few species within different orders and does not include neotropical species. The same argument can also be made for the mechanisms of oocyte development in diplopods, which are highly variable and even less well-studied than ovarian morphology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Gerson Mello and Cristiane Milleo for technical support, professor Sergei Golovatch (Moscow, Russia), who kindly helped with the editing and proofreading of this study, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the scholarship provided to the first author, to CNPq, and to Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU/MCT/CNPq/UFMT) and PRONEX/2009 (FAPEMAT/CNPq) for the financial support provided for the project. The author declare that have no conflict of interest involve in this manuscript.

## REFERENCES

- Anderson E, Telfer WHA. 1970. A follicle cell contribution to the yolk spheres of month oocytes. *Tissue Cell* 1: 633-644.
- Bast RE, Telfer WH. 1976. Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the *Cecropia* moth oocyte. *Dev Biol* 52: 83-97.
- Battirola LD, Marques MI, Rosado-Neto GH, Pinheiro TG, Pinho NGC. 2009. Vertical and time distribution of Diplopoda (Arthropoda, Myriapoda) in a monodominant forest in Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Zoologia* 26: 479-487.
- Biswas S, Sarren ML, Gill A. 1987. Ovarian structure and the role of nucleolar emissions in vitellogenesis of *Thyropygus nigrolabiatus* (Newport). *Uttar Pradesh J Zool* 7: 70-75.

Camargo-Mathias MI, Fontanetti CS, Micó-Balaguer E. 1998. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Cytobios* 94: 169-184.

Cave MD. 1982. Morphological manifestations of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. In: *Insect Ultrastructure*. Akai H, King R, editors. Plenum Publishing Co, New York pp.86-117.

Crane DF, Cowden RR. 1968. A cytochemical study of oocyte growth in four species of millipedes. *Z Zellforsch Microsk Anat Histochem* 90: 414-431.

Fabre L. 1855. Recherches sur l'Anatomie des organes reproducteur et sur le developpement des Myriapodes. *Ann Sci Nat (Zool)* 3: 256-320.

Fontanetti CS, Staurengo da Cunha MA. 1993. Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Rev Bras Biol* 3: 7-12.

Fontanetti CS, Zironi MC. 2000. Initial development of the diplopod *Plusioporus setiger* (Broleman, 1901) under populational expansion in coffee plantations (Spirostreptida, Spirostreptidae). *Arq Inst Biol* 67: 55-62.

Fontanetti CS, Camargo-Mathias MI. 2004. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). *Acta Histochem Cytochem* 37: 301-306.

Fontanetti CS, Souza T da S, Calligaris IB, Bozzatto V. 2010. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. *Anim Biol* 60: 467-478.

Freitas VC de, Zironi MC, Fontanetti CS. 2003. Ovarian morphology in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda, Arthropoda). *Braz J Morphol Sci* 20: 153-156.

Gealekman O, Tichomirova E, Warburg M. 1996. Phenology and reproduction of the iulid millipedes *Catamicrophyllum* spp. inhabiting the Mediterranean region in northern Israel. *Isr J Zool*, 42: 66.



- Herbaut C, Joly R. 1972. Activité ovarienne et cycle ovogénétique chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Arch Zool Exp Gen 113: 215- 225.
- Hopkin SP, Read HJ. 1992. The biology of millipedes. New York: Oxford University Press. 248 p
- Junqueira LCU, Junqueira MG. 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Livraria Editora Santos. 144 p
- King PE. 1925. Oogenesis in *Lithobius forficatus*. Sci Proc R Dublin Soc 18: 29- 36.
- Kubrakiewicz J. 1987. The ovary structure in two species of millipedes, *Iulus scandinavicus* and *Orthomorpha gracilis* (Myriapoda, Diplopoda). Zool Pol 34: 251-260.
- Kubrakiewicz J. 1989. Deposition of calcium salts in oocytes and ovarian somatic tissue of millipedes. Tissue Cell, 21: 444-446.
- Kubrakiewicz J. 1991a. Ultrastructural investigation of ovary structure of *Ophiulus pilosus* (Myriapoda, Diplopoda). Zoomorphology 110: 133-138.
- Kubrakiewicz J. 1991b. Ovary structure and oogenesis of *Polyxenus lagurus* (L.) (Diplopoda: Pseulaphognatha). An ultrastructural study. Zool Jahrb Abt Anat Ontogenie Tiere 121: 81-93.
- Lison L. 1985. Histochimie et cytochimie animales. Paris: Gauthier-Villars. 842p
- Makioka T. 1988. Ovarian structure and oogenesis in chelicerates and other arthropods. Proc Arth Embry Soc J 23: 1-11.
- Mello MLS, Vidal BC 1980. Práticas de biologia celular. São Paulo: Edgar Blucher-Funcamp. 69p.
- Miley HH. 1930. Internal anatomy of *Euryurus erytropygus* (Brandt, Diplopoda). Ohio J Sci 40: 229 -254.
- Nadarajalingam K, Subramonian, T. 1984. Oogenesis in a millipede *Spirostreptus asthenes* (Myriapoda, Diplopoda). Zool Anz 212: 229-239.

- Nair VSK. 1981. Oocyte developmental and vitellogenesis in *Jonespeltis splendidus* (Myriapoda: Diplopoda). J Anim Morphol Physiol 28: 186-194.
- Newport G. 1841. The Bakerian lecture: on the organs of reproduction, and the development of the Myriapoda. Philos Trans R Soc London 31: 99 – 130.
- Pearse AGE. 1985. Histochemistry: Theoretical and Applied. Edinburgh: Churchill Livingstone. 642p.
- Petit J. 1970. Sur la et l'acumulation de substances minerales dans lês ovocytes de *Polydesmus complanatus* (Myr. Dipl.). C R Seances Acad Sci D 2107-2110.
- Pinheiro TG, Marques MI, Battirola LD. 2009. Life cycle of *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). Zoologia 26: 658–662.
- Ramamurty PS. 1968. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly *Panorpa communis*. J Insect Physiol 14: 1325-1330.
- Sareen ML. 1967. Cytochemical studies on the female germ cells of a common millipede, *Phyllogonostreptus nigrolaciatus* (Newport). Res Bull Panjab Univ 18: 363-368.
- Sareen ML, Adiyodi KG. 1983. Arthropoda-Myriapoda. In: Reproductive Biology of Invertebrates. Oogenesis, oviposition and oosorption. Adiyodi KG, Adiyodi RG, editors. Vol. 1, Wiley & Sons, New York, pp 497-520.
- Seifert B. 1932. Anatomie und Biologie des Diplopoden *Strongylosoma pallipes* Oliv. Z Morphol Ökol Tiere 25: 362 – 507.
- Sharma G, Chhotani OB. 1957. The millipede egg. Res. Bull. Panjab Univ. Sci 103: 2241-2250.
- Warburg MR, Gealekman O. 2000. Ovarian structure and oogenetic cycle in the millipede *Catamicrophyllum caifanum* (Diplopoda: Iulidae). J Zool 250: 79-85.
- Warburg MR, Rosenberg M, Johns PM. 1998. Ovarian structure in a millipede, *Eumastigonus* sp. (Diplopoda, Cambalidae). N Z J Zool 25: 301-306.

Yahata K, Makioka T. 1994. Phylogenetic implications of structure of adult ovary and oogenesis in the penicillate diplopod, *Eudigraphis nigricans* (Miyosi) (Diplopoda: Myriapoda). J Morphol 222: 223-230.

Yahata K, Makioka T. 1997. Phylogenetic significance of the structure of adult ovary and oogenesis in a primitive chilognathan diplopod, *Hyleoglomeris japonica* Verhoeff (Glomerida, Diplopoda). J Morphol 231: 277-285.

**Table 1** – Results of the histochemical tests applied on the oocytes of (A) *P. salvator*, (B) *M. hastatus* and (C) *T. klossae*

Oocytes	Region	Lipid			Protein						Polysaccharides			Calcium					
		Nile blue			xylidine ponceau			bromophenol blue			Neutral			Acid			von Kossa		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Stage I		++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	-	-	-	+++	+	-	
Stage II	Cytoplasm	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+++	+++	+++	
Stage III	Chorion	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	
		++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	

(-) negative; (+) weakly positive; (++) moderately positive; (+++) strongly positive.

## FIGURES LEGENDS

**Fig. 1.** Schematic presentation of the ovary of *P. salvator* and *M. hastatus* (A) and *T. klossae* (B).

em: external membrane; I, II and III: oocyte at stage I, II and III; oo: oocyte; os: ovisac; osm: ovisac membrane; ov: oviduct.

**Fig. 2.** Histological sections of *P. salvator* stained with haematoxylin and eosin (A-D) and submitted to the simultaneous technique of Alcian blue/PAS (E, F).

c: chorion; em: external membrane; fb: fat body; fc: follicular cells; gl: globules of vitellus; gv: germ vesicle; nu: nucleolus; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III.

**Fig. 3.** Histological sections of *P. salvator* submitted to the techniques of bromophenol blue (A, B), xylydine ponceau (C), Nile blue (D) and von Kossa (E, F).

c: chorion; Ca: granules of calcium; em: external membrane; fb: fat body; gl: globules of vitellus; gv: germ vesicle; nu: nucleolus; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III.

**Fig. 4.** Histological sections of *M. hastatus* stained with haematoxylin and eosin (A, B) and submitted to the simultaneous techniques of Alcian blue /PAS (C-E).

c: chorion; em: external membrane; fb: fat body; fc: follicular cells; gl: globules of vitellus; gv: germ vesicle; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III.

**Fig. 5.** Histological sections of *M. hastatus* submitted to the techniques of xylydine ponceau (A, B), Nile blue (C, D) and von Kossa (E).

c: chorion; Ca: granules of calcium; em: external membrane; fb: fat body; gl: globules of vitellus; gv: germ vesicle; nu: nucleolus; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III.

**Fig. 6.** Histological sections of the ovary of *T. klossae* stained with haematoxylin and eosin (A-D) and submitted to the simultaneous techniques of Alcian blue/PAS (E, F).

c: chorion; em: external membrane; fb: fat body; fc: follicular cells; fe: follicular epithelium; gv: germ vesicle; nu: nucleolus; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III; os: ovisacs.

**Fig. 7.** Histological sections of the ovary of *T. klossae* submitted to the techniques of xylidine ponceau (A), bromophenol blue (B), Nile blue (C, D) and von Kossa (E, F).

c: chorion; Ca: granules of calcium; em: external membrane; ool: oocyte at stage I; ooll: oocyte at stage II; oolll: oocyte at stage III; os: ovisac.

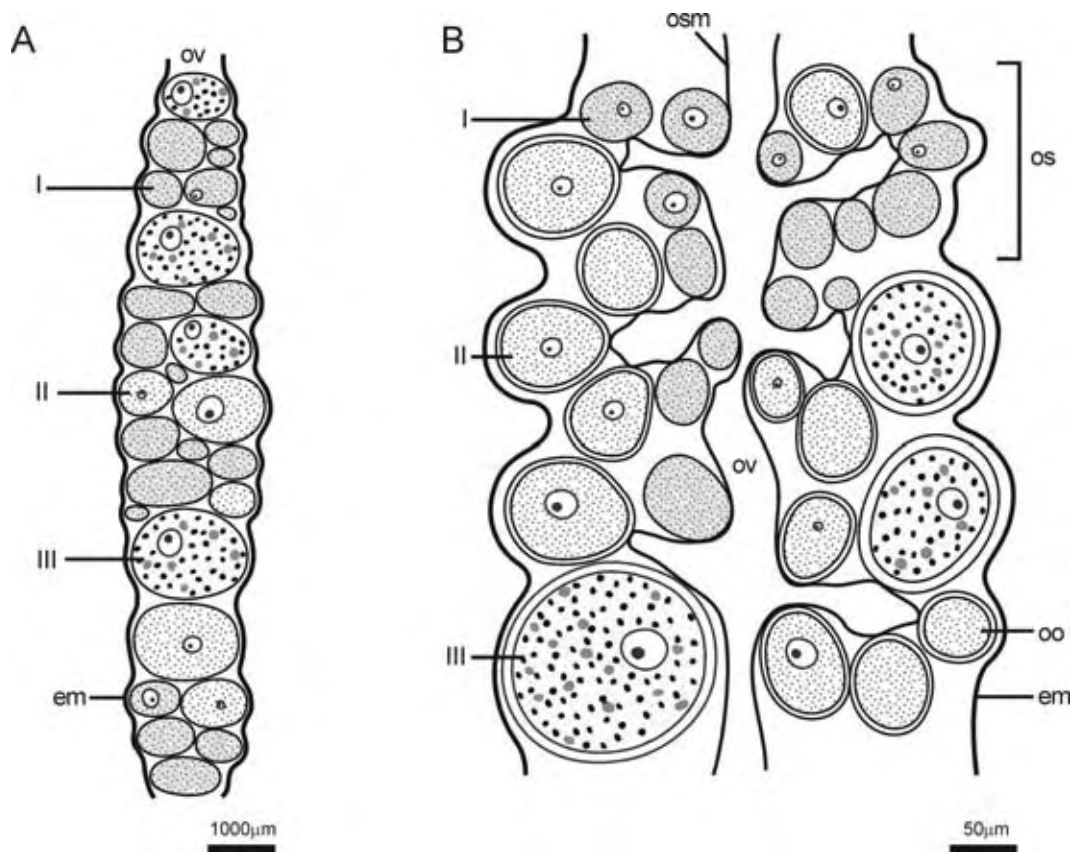


Figure 1

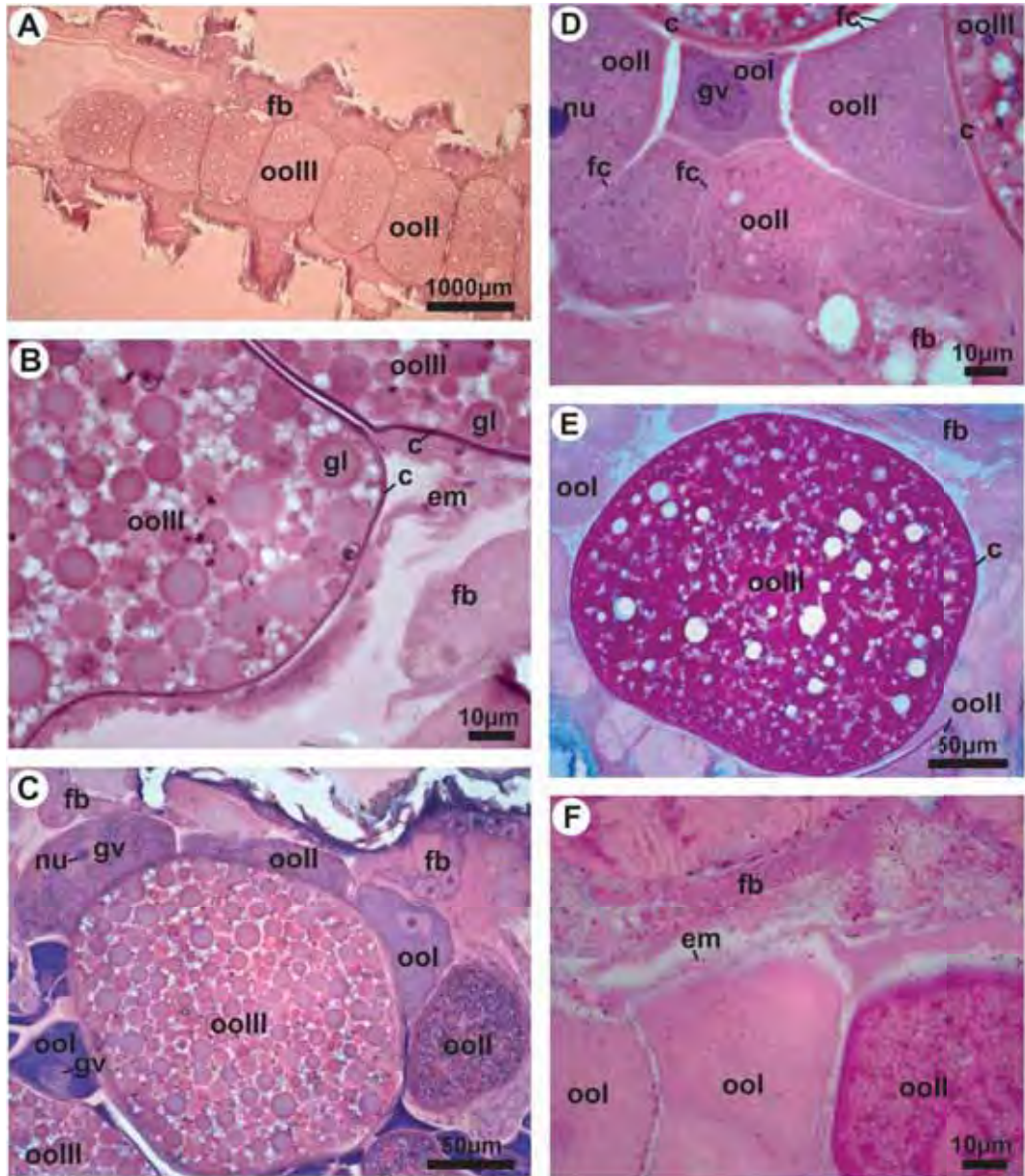


Figure 2



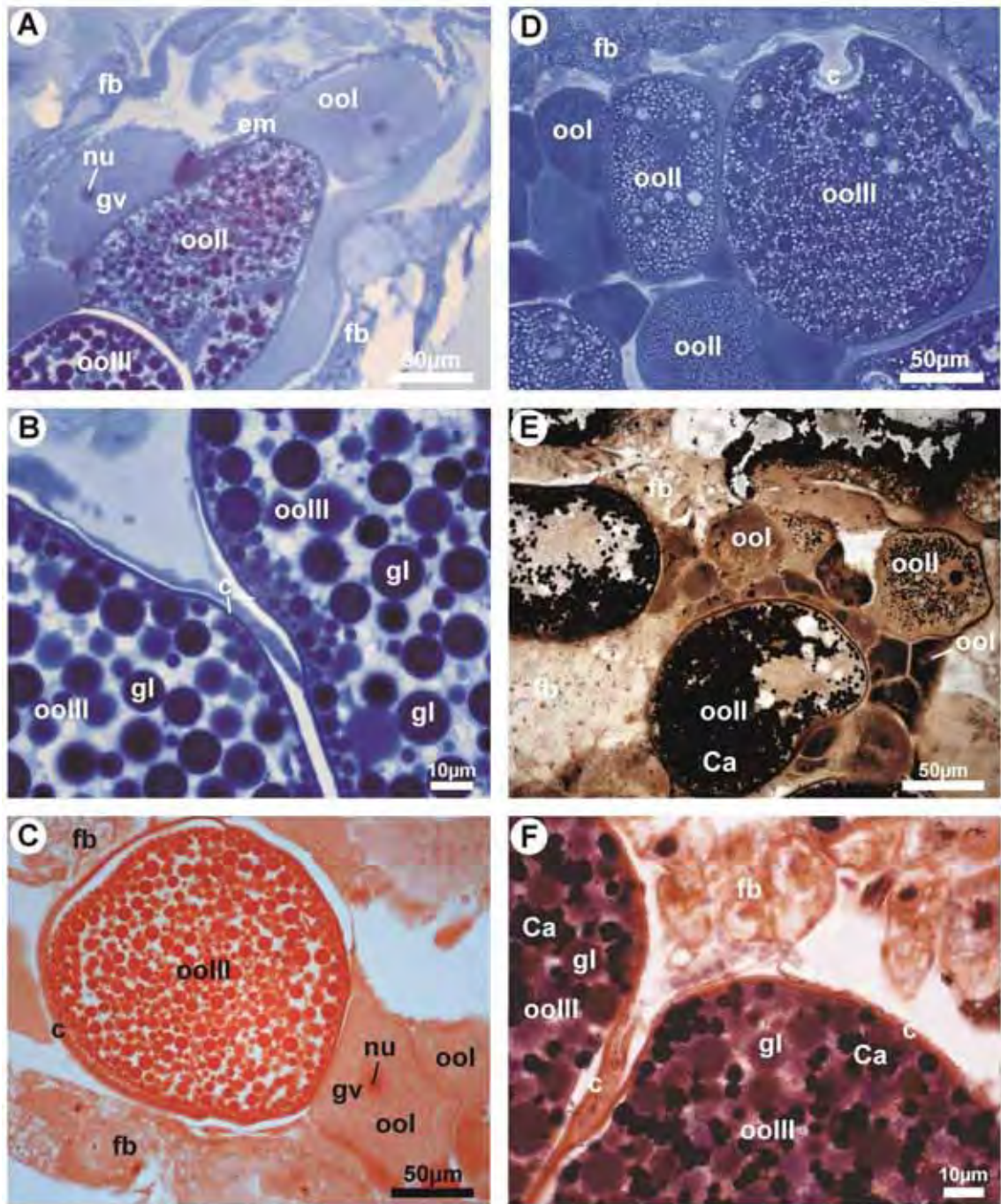


Figure 3

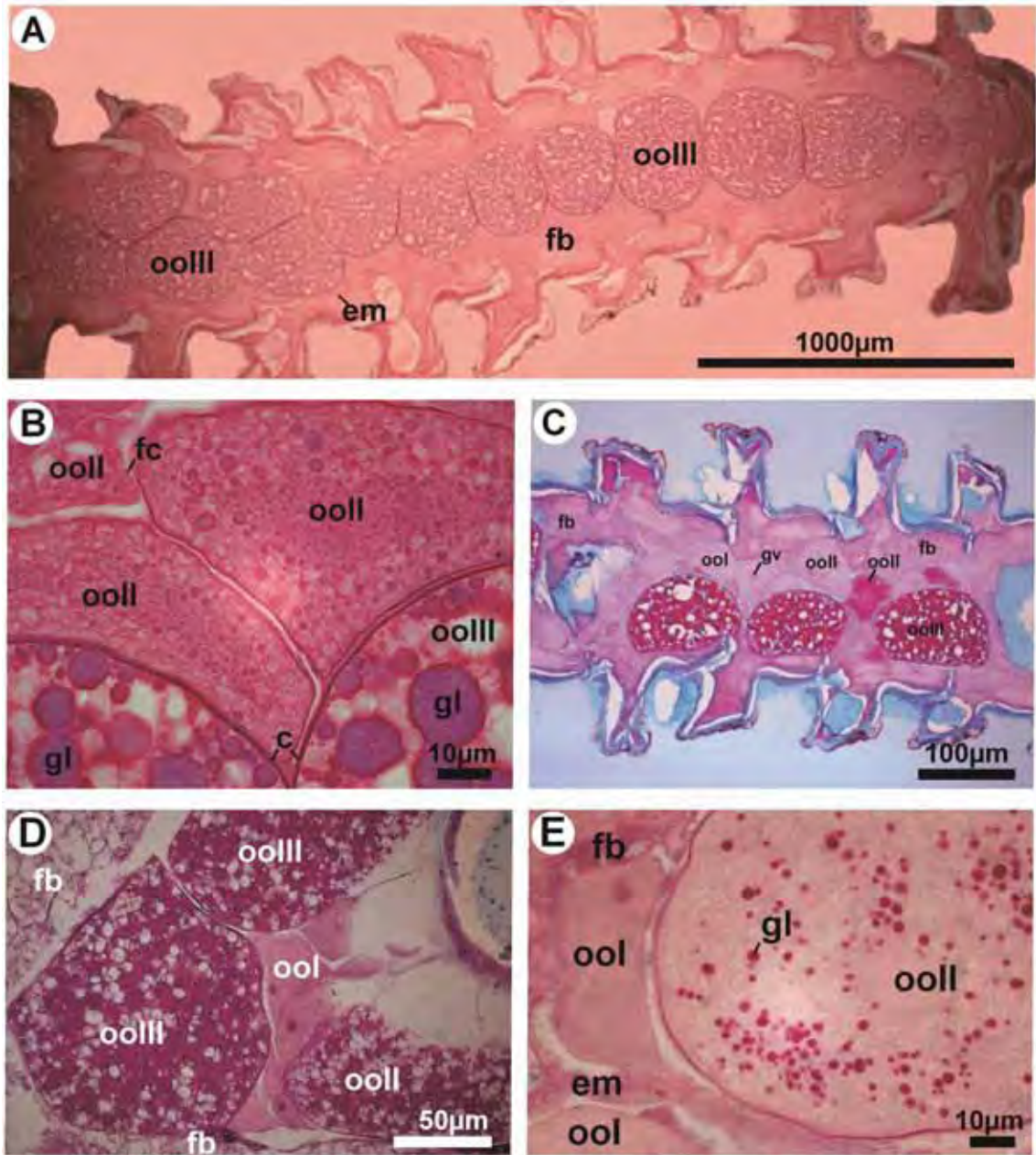


Figure 4



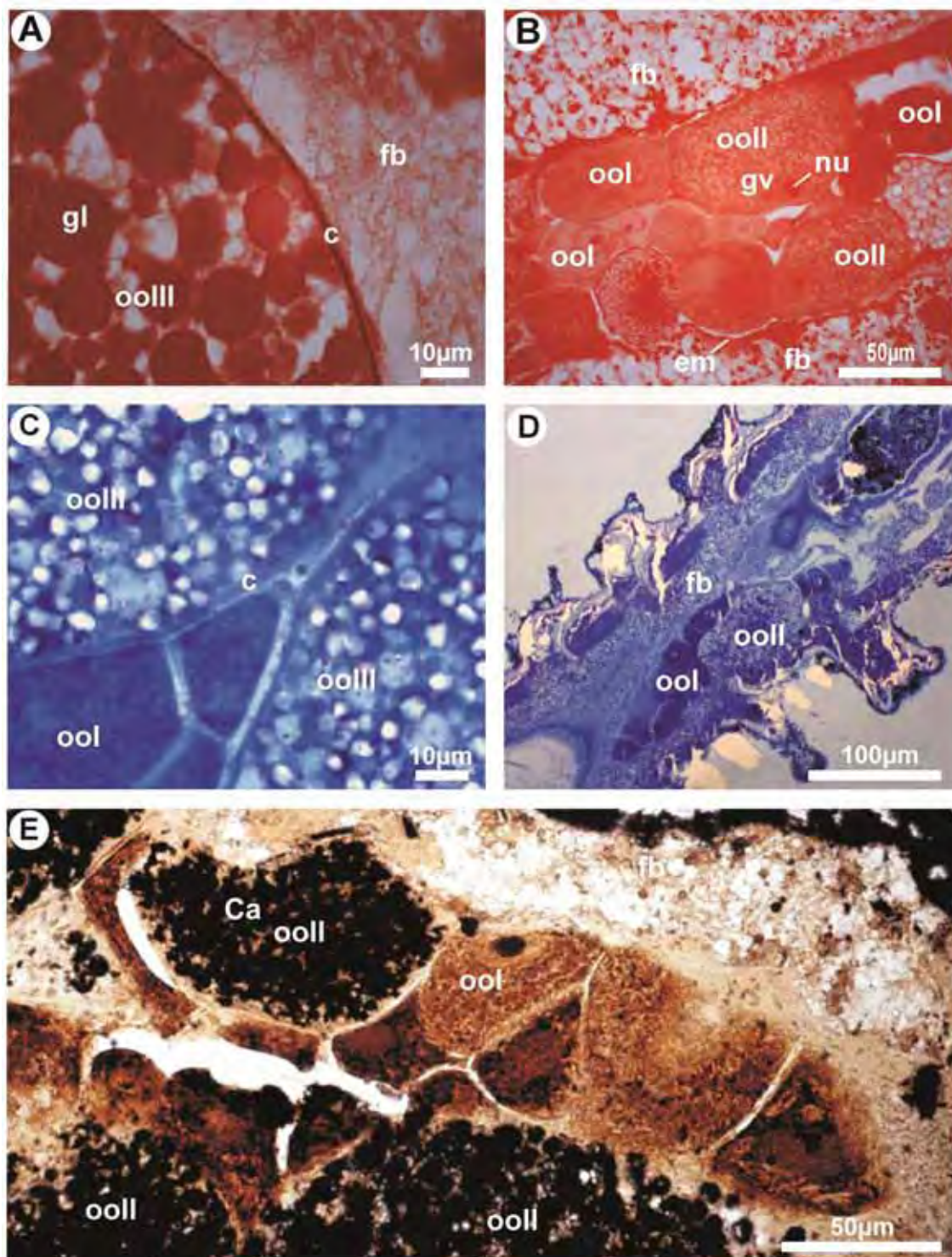


Figure 5

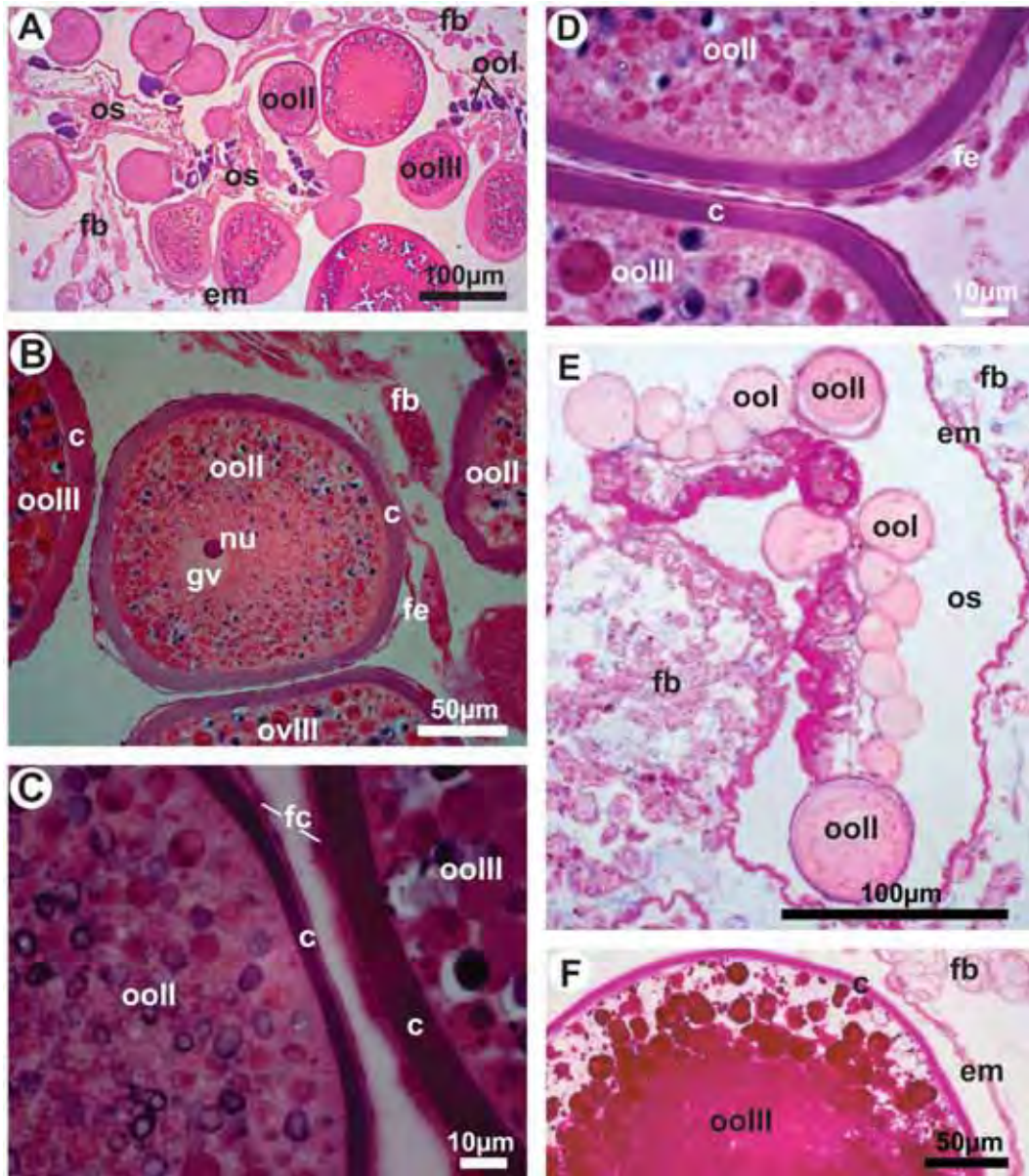


Figure 6



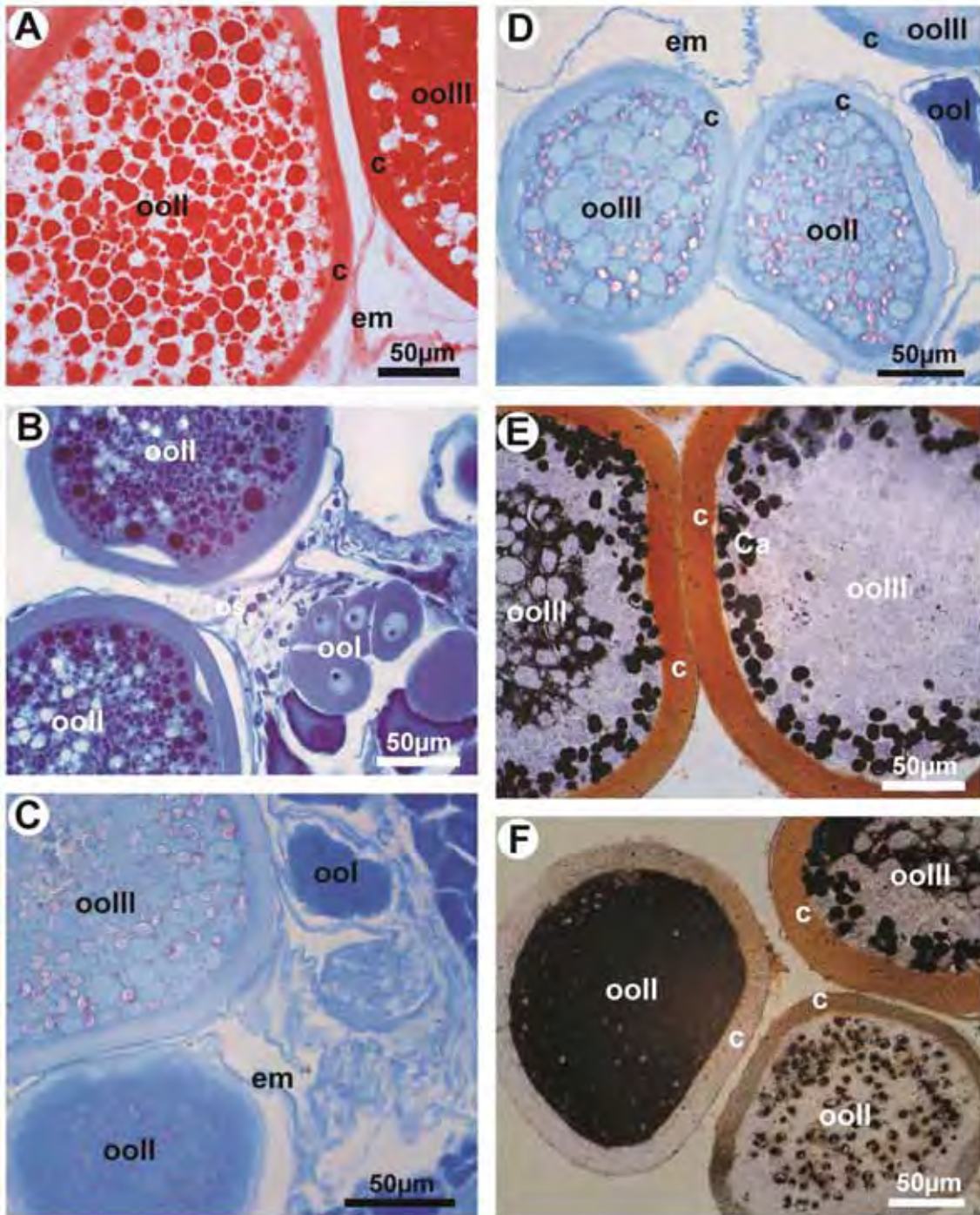


Figure 7

**Comparative study of the ovarian morphology in the order Polydesmida  
(Diplopoda) and description of unusual structures  
in the female reproductive system**

Tamaris Gimenez Pinheiro<sup>1</sup>; Marinêz Isaac Marques<sup>2</sup> and Carmem Silvia Fontanetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil, 13506-900.

<sup>2</sup>UFMT (Universidade Federal de Mato Grosso), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Instituto de Biociências, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, 78060-900.

\*Corresponding author: Carmem Silvia Fontanetti. UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia. Rio Claro, SP, Brazil, CEP 13506-900. Telephone: 55 19 3526 4139. Email: fontanet@rc.unesp.br.

**Number of figures:** 3

**Running title:** Comparative study of ovarian morphology in Diplopoda

**Abstract**

Polydesmida is the largest order in the class Diplopoda in terms of the number of species, genera and families, but there are few studies of the ovarian morphology of species in this order. This study aimed to perform a comparative study of the ovarian morphology of three species from this order to increase the understanding of the morphological evolution of this system in Polydesmida. Adults females of two of these species, *Poratia salvator* and *Myrmecodesmus hastatus*, belonging to the family Pyrgodesmidae, had a unpaired ovary that formed a tubular organ containing oocytes, with *P. salvator* present grouping of oocytes into a structure similar to ovisacs. This condition appeared to be apomorphic and was associated with the small size of these species (<10 mm) and their short life cycle. The third species, *Telonychopus klossae* (Chelodesmidae), had a large body and an ovary with paired ovisacs, which was symplesiomorphic with other Polydesmida families.

**Keywords:** Apomorphy, millipedes, reproduction, synapomorphy.

## Resumo

Polydesmida é a maior ordem da classe Diplopoda em número de espécies, gêneros e famílias, entretanto, existem poucos estudos sobre a morfologia ovariana de suas espécies. Esta pesquisa teve como objetivo realizar um estudo comparativo sobre a morfologia ovariana de três espécies dessa ordem, a fim de contribuir para discussões sobre a evolução morfológica deste sistema no grupo. Duas dessas espécies, *Poratia salvator* e *Myrmecodesmus hastatus*, representantes da família Pyrgodesmidae, apresentam ovário como um órgão tubular único, com a primeira possuindo os ovócitos agrupados em uma estrutura semelhante a ovissacos. Esta condição parece ser uma apomorfia, aparentemente associada ao tamanho diminuto dos animais destas espécies (menos de 10 mm) e suas histórias de vida curtas. A terceira espécie, *Telonychopus klossae*, um quelodesmídeo de tamanho corporal grande, possui um ovário pareado com presença de ovissacos, condição simplesiomórfica no grupo, semelhante à de outras famílias de Polydesmida.

**Palavras-chave:** Apomorfia, milípedes, reprodução, sinapomorfia.



## Introduction

The ovarian morphology of the Diplopoda has been used to support discussions of the phylogenetic relationships within this group, comparisons between two subclasses of millipedes (Chilognata and Penicillata) and comparisons with other classes within Arthropoda (Yahata and Makioka, 1994, 1997; Freitas et al., 2003). However, there have only been a few morphological studies of the female reproductive system of species in this group, which were restricted mostly to Asian species (Freitas et al., 2003).

This shortage of studies is particularly pronounced in the order Polydesmida. This is the most diverse order among the Diplopoda; however, there have only been five reports on the ovarian morphology of species in this order (Miley, 1930; Seifert, 1932; Kubrakiewicz, 1987; Nair, 1981; Zironi et al., 2013).

Millipede females have reproductive organs located between the digestive tract and central nervous cord, which opens into the third body segment just behind the second pair of legs (Hopkin and Read, 1992). Unlike in other Myriapoda, where the ovary is a single tubular organ, the ovaries of millipedes are described as unpaired structures (Newport, 1841; Nadarajalingam and Subramonian, 1984; Kubrakiewicz, 1987, 1991a, b; Yahata and Makioka, 1994, 1997; Freitas et al., 2003) and as paired structures (Miley, 1930; Seifert, 1932; Fontanetti et al., 2010). In some species, the oocytes are distributed in two paired strands in the immature ovary, but gradually lose their symmetry due to the developing of the oocytes (Nair, 1981; Fontanetti and Staurengo da Cunha, 1993; Gealekman et al., 1996; Warburg and Gealekman 2000).

The order Polydesmida contains 5,480 species, 1,437 genera and 30 families (Hoffman et al., 2002; Shelley, 2003). The adults range from 2 to 130 mm in length and many families have a wide variety of colours and shapes. They mostly inhabit the soil surface and litter, but a few are strictly arboreal (Hoffman et al., 1996, 2002). Many of the species have a short life cycle, which is completed within one year (Adis et al., 2000; Bergholz, 2007; Battirola et al., 2009; Pinheiro et al., 2009). An important reproductive characteristic of many species in this order is the construction of nests for egg protection, mainly against variations in humidity and temperature (Bano and Krishnamoorthy, 1985; Vohland and Adis, 1999; Voigtlander, 2000; Pinheiro et al. 2009).

There is a lack of information available on the ovarian morphology of neotropical species of millipedes and the different configurations of the reproductive organs in this class. Thus, this study aimed to perform a comparative study of the ovarian morphology of three species in this order: *Poratia salvator* Golovatch & Sierwald, 2000, *Myrmecodesmus hastatus* (Schubart, 1945) (both Pyrgodesmidae) and *Telonychopus klossae* Hoffman, 1965 (Chelodesmidae) to facilitate discussions on the morphological evolution of this system in Polydesmida.

### Materials and methods

*Poratia salvator* and *M. hastatus* were collected in Brazil from the Base Avançada de Pesquisas do Pantanal, which belongs to the Universidade Federal de Mato Grosso, and SESC Baía das Pedras, a unit of the Estância Ecológica SESC Pantanal nearby of the city of Poconé in the north of the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Telonychopus klossae* was collected in the city of Cuiabá, Mato Grosso at the Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil.

All species were collected in 2011 and maintained in plastic containers covered by lids and containing a small amount of organic matter. The specimens were identified and separated based on species, sex and development time. They were transported in a polystyrene insulated box to the Department of Biology, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus Rio Claro, São Paulo State, Brazil.

Females were anaesthetised with ethyl ether and dissected in physiological solution to remove their ovaries. For ultramorphological analysis, samples were fixed with glutaraldehyde solution in a 2.5% solution of 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4°C for at least 2 h. Samples were then dehydrated using an ascending series of acetone solutions with concentrations of 50%, 75%, 90% and 95% for 10 min each, followed by three 10 minutes immersions in 100% acetone. Samples were subjected to critical point drying and sputter-coated. Images were acquired using a TM-3000 (Hitachi High Technologies) low vacuum bench scanning electron microscope (SEM).

To complement and correct establishment of ovarian morphology, the ovaries were processed for histological examination with the material being fixed in alcoholic Bouin solution, dehydrated in ethanol series and stained with hematoxylin and eosin.

The slides were analysed under a light microscope, and the images were captured using Leica IM50 software, version 5 Release 220, in order to record the results.

## Results

The ovary of *P. salvator* was an unpaired structure (Figures 1A, D), but it was noteworthy that oocytes at different stages of development appeared to be grouped, independently of each other, into a structure that was similar to an ovisac (Figures 1A, B, E). The ovisacs were coated with a very thin membrane that was associated with numerous tracheoles (Figures 1B, C). The ovisacs were in close contact with the fat body, which was not highly developed in this species (Figure 1A). The corium of the oocytes lacked ornamentation (Figures 1B, C).

The ovary of *M. hastatus* was also an unpaired structure (Figures 2A, D), but there was no clustering of oocytes into ovisacs (Figures 2A, D). The organ was immersed in the fat body, which was well developed in this species (Figures 2A, B). The surface of the oocytes had an irregular appearance (Figure 2C). Numerous tracheoles were also associated with the ovary in this species (Figures 2B, C).

*Telonychopus klossae* had paired ovaries (Figures 3A, B) and the oocytes at different stages of development were grouped into ovisacs (Figures 3B, C, D). The fat body was well developed in this species and it was in close contact with the ovaries (Figures 3A, B). The oocytes were clustered within a membrane, which gave the appearance of trusses (Figures 3B, D). For the first time, the presence of micropyles was observed in Diplopoda (arrows and detail in Figure 3C). The surface of the oocytes was uniform and it lacked ornamentation (Figures 3C, D).

## Discussion

*Poratia salvator* and *M. hastatus* are both very small species (<10 mm) and their ovaries formed an unpaired structure. However, *P. salvator* possessed a structure that was similar to an ovisac, which is an unprecedented feature in millipede species with unpaired ovaries.

The presence of an unpaired ovary and the absence of ovisacs in *M. hastatus* has also been described for the following species: in the order Polyxenida (Polyxenidae), *Eudigraphis nigricans* (Miyosi, 1947) (Yahata and Makioka, 1994) and *Polyxenus lagurus* (Linnaeus, 1758) (Kubrakiewicz, 1991b); in the order Glomerida (Doderiidae) *Hyleoglomeris japonica* Verhoeff, 1936 (Yahata and Makioka, 1997); in

the order Spirostreptida "*Spirostreptus*" *asthenes* Pocock, 1892 (Spirostreptidae) (Nadarajalingam and Subramonian, 1984), *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 and *P. tricolor* Brölemann, 1901 (Pseudonannolenidae) (Freitas et al., 2003); and in the order Julida (Julidae), *Julus terrestris* Linnaeus, 1758 (Newport, 1841) and *Ophiulus pilorus* (Newport, 1842) (Kubrakiewicz, 1991a).

In the order Polydesmida, the unpaired ovary is known only in one species in the Paradoxosomatidae, *Oxidus gracilis* (C.L. Koch, 1847) (= *Orthomorpha gracilis*) (Kubrakiewicz, 1987). Another Paradoxosomatidae species, *Anoplodesmus splendidus* (Verhoeff, 1936) (= *Jonespeltis splendidus*), has one paired ovary in newly moulted females that loses the symmetry conforming advances the oocytes development, becoming into an unpaired structure (Nair, 1981).

This might suggest that the possession of ovaries with an unpaired structure by species in the family Pyrgodesmidae is an apomorphic condition, which probably reflects the small size of individuals in this family (<10 mm) and their short lifespan of about 3 months (Adis et al., 2000; Pinheiro et al., 2009). An apomorphic condition with an unpaired ovary was also suggested by Freitas et al. (2003) for *Pseudonannolene* spp., which have unpaired ovaries without pairing of the germarium, and this is considered by other authors to be the most derived model among the millipedes. According to Sareen and Adiyodi (1983) and Kubrakiewicz (1987), this condition may be an evolutionary specialisation because it appears in several independent Myriapoda groups.

However, the pairing of the mature ovary observed in *T. klossae* has also been observed in other species in the order Polydesmida, i.e., *Euryurus erythropygus* (Brandt, 1841) (= *Euryurus carolinensis*) (Euryuridae) (Miley, 1930), *Strongylosoma pallipes* (Olivier, 1792) (Paradoxosomatidae) (Seifert, 1932) and *Leptodesmus dentellus* Schubart, 1946 (Chelodesmidae) (Zirondi et al., 2013).

Based on this information, it may be suggested that, in contrast to the claim of Fontanetti and Staurengo da Cunha (1993), the morphology of the female millipede reproductive system is not constant among families, and follows the same trends that are found in the male reproductive system, which are also highly diverse (Kanaka and Chowdaiah, 1974; Freitas et al., 2003; Fontanetti, 1991; Freitas and Fontanetti, 2005).

## Acknowledgements

The authors would like to thank Gerson Mello, Cristiane Milleo, Antônio Yabuki and Mônica Lamonte for technical support; Professor Sergei Golovatch (Moscow, Russia) and Fernando José Zara (UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo, Brazil), who kindly helped with the editing and proofreading of this study; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the scholarship provided to the first author; CNPq; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU/MCT/CNPq/UFMT) and PRONEX/2009 (FAPEMAT/CNPq) for financial support provided to the project.

## References

- ADIS, J., GOLOVATCH, SI., LARS, W. and HANSEN, B. On the identities of *Muyudesmus obliteratus* Kraus, 1960 versus *Poratia digitata* (Porat, 1889), with first biological observations on parthenogenetic and bisexual populations (Diplopoda: Polydesmida: Pyrgodesmidae). In: WYTWER, J. and GOLOVATCH, SI. *Progress in studies on Myriapoda and Onychophora*. Warszawa: Fragmenta Faunística (Supplement), 2000, no. 43, p. 149-170.
- BANO, K. and KRISHNAMOORTHY, RV., 1985. Reproductive strategy and life history of *Jonespeltis splendidus* (Verhoeff) (Diplopoda: Polydesmida) with environmental synchronization. *Journal of Soil Biology and Ecology*, vol. 5, no. 1, p. 48-57.
- BATTIROLA, LD., MARQUES, MI., ROSADO-NETO, GH., PINHEIRO, TG. and PINHO, NGC., 2009. Vertical and time distribution of Diplopoda (Arthropoda, Myriapoda) in a monodominant forest in Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Zoologia*, vol. 26, p. 479-487.
- BERGHOLZ, NGR., 2007. Ecological traits and genetic variation in Amazonian populations of the Neotropical millipede *Poratia obliterata* (Kraus, 1960) (Diplopoda: Pyrgodesmidae) (Brazil). *Invertebrate Ecology & Conservation Monographs*. Sofia: Pensoft Publishers, 197p.

FONTANETTI, CS., 1991. Morphology of testicles of some Brazilian species of Diplopoda and their phylogenetic relations. *Revista Brasileira de Zoologia*, vol. 7, p. 541-544.

FONTANETTI, CS. and STAURENGO DA CUNHA, MA., 1993. Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Revista Brasileira de Biologia*, vol. 53, no. 1, p. 7-12.

FONTANETTI, CS., SOUZA, T da S., CALLIGARIS, IB. And BOZZATTO, V. 2010. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. *Animal Biology*, vol. 60, p. 467–478.

FREITAS, VC. and FONTANETTI, CS. 2005. Testicular morphology and histochemical of *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 (Diplopoda, Pseudonannolenidae). *Naturalia*, vol. 28-30, p. 24-27.

FREITAS, VC. De, ZIRONDI, MC. and FONTANETTI, CS., 2003. Ovarian morphology in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda, Arthropoda). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 153-156.

GEALEKMAN, O.; TICHOMIROVA, E.; WARBURG, M. 1996. Phenology and reproduction of the iulid millipedes *Catamicrophyllum* spp. inhabiting the Mediterranean region in northern Israel. *Israel Journal of Zoology*, vol. 42, p. 66.

HOFFMAN, RL., GOLOVATCH, SI., ADIS, J. and MORAIS, JW. de., 1996. Pratical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). *Amazoniana*, vol. 14, no. 1/2, p. 1-35.

HOFFMAN, RL., GOLOVATCH, SI., ADIS, J. and MORAIS, JW. de. Diplopoda. In: ADIS, J. *Amazonian Arachnida and Myriapoda*. Sofia: Pensoft Plubishers, 2002, 590p.

HOPKIN, SP. and READ, HJ. *The biology of millipedes*. New York: Oxford University Press, 1992, 232 p.

- KANAKA, R. and CHOWDAIAH, RN., 1974. Studies on the male reproductive pattern in some Indian Diplopoda (Myriapoda). *Symp. Zoot. Soc. London*, vol. 32, p. 261-272.
- KUBRAKIEWICZ, J., 1987. The ovary structure in two species of millipedes, *Iulus scandinavicus* and *Orthomorpha gracilis* (Myriapoda, Diplopoda). *Zool. Polon.*, vol. 34, p. 251-260.
- KUBRAKIEWICZ, J., 1991a. Ultrastructural investigation of ovary structure of *Ophiulus pilosus* (Myriapoda, Diplopoda). *Zoomorphology*, vol.110, p. 133-138.
- KUBRAKIEWICZ, J., 1991b. Ovary structure and oogenesis of *Polyxenus lagurus* (L.) (Diplopoda: Pseulaphognatha). An ultrastructural study. *Zoologische Jahrbücher (Anatomie)*. vol. 121, p. 81-93.
- MILEY, HH., 1930. Internal anatomy of *Euryurus erytropygus* (Brandt, Diplopoda). *Ohio Journal of Science*, vol. 40, p. 229 -254.
- NADARAJALINGAM, K. and SUBRAMONIAN, T., 1984. Oogenesis in a millipede *Spirostreptus asthenes*. *Zool. Anz. Jena*, vol. 212, no. 3/4, p. 229-239.
- NAIR, VSK., 1981. Oocyte developmental and vitellogenesis in *Jonespeltis splendidus* (Myriapoda: Diplopoda). *Journal of Animal Morphology and Physiology*, vol. 28, p. 186-194.
- NEWPORT, G., 1841. The Bakerian lecture: on the organs of reproduction, and the development of the Myriapoda. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 31, p. 99 – 130.
- PINHEIRO, TG., MARQUES, MI. and BATTIROLA, LD., 2009. Life cycle of *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). *Zoologia*, vol. 26, no. 4, p. 658–662.
- SAREEN, ML. and ADIYODI, KG. Arthropoda-Myriapoda. 1. Oogenesis, oviposition and oosorption. In ADIYODI, KG. and ADIYODI, RG. *Reproductive biology of invertebrates*. Chichester: Wiley & Sons, 1983, p. 497-520.

SEIFERT, B., 1932. Anatomie und Biologie des Diplopoden *Strongylosoma pallipes*. *Oliv. Zeits. Fur Morph. Und Okol. Tiere*, vol. 25, p. 362 – 507.

SHELLEY, RM., 2003. A revised, annotated, family-level classification of Diplopoda. *Arthropoda Selecta*, vol. 11, no. 3, p. 187-207.

VOHLAND, K. and ADIS, J., 1999. Life history of *Pycnotropis tida* (Diplopoda: Polydesmida: Aphelidesmidae) from seasonally inundated forest in Amazonia (Brazil and Peru). *Pedobiologia*, vol. 43, p. 231-244.

VOIGTLÄNDER, K., 2000. Observations on nest construction by *Polydesmus denticulatus* C. L. Koch, 1847. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseum Görlitz*, vol. 72, p. 235-237.

WARBURG, MR. and GEALEKMAN, O., 2000. Ovarian structure and oogenetic cycle in the millipede *Catamicrophyllum caifanum* (Diplopoda: Iulidae). *Journal of Zoology*, vol. 250, p. 79-85.

WARBURG, MR., ROSENBERG, M. and JOHNS, PM., 1998. Ovarian structure in a millipede, *Eumastigonus* sp. (Diplopoda, Cambalidae). *New-Zealand Journal of Zoology*, vol. 25, p. 301-306.

YAHATA, K. and MAKIOKA, T., 1994. Phylogenetic implications of structure of adult ovary and oogenesis in the penicillate diplopod, *Eudigraphis nigricans*(Miyosi) (Diplopoda: Myriapoda). *Journal of Morphology*, vol. 222, p. 223-230.

YAHATA, K. and MAKIOKA, T., 1997. Phylogenetic significance of the structure of adult ovary and oogenesis in a primitive chilognathan diplopod, *Hyleoglomeris japonica* Verhoeff (Glomerida, Diplopoda). *Journal of Morphology*, vol. 231, p. 277-285.

ZIRONDI M. C ; PINHEIRO, T. G. ; FONTANETTI, C. S. 2013. Ovarian morphology and oogenesis of *Leptodesmus dentellus* (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae) *Animal Biology*, p. 1-16.



## Figure legends

**Figure 1** – A–C: *Poratia salvator* ovary; D–E: histological sections of *P. salvator*. (A) Ovarian positioning and general structure of well-developed oocytes; (B) ovisacs; (C) detail of undeveloped oocytes; (D) ovarian general structure and oocyte distribution; (E) detail of an ovisac.

em: external membrane; fb: fat body; g: gut; oo: oocyte; ool: oocyte in stage I; ooll: oocyte in stage II; oolll: oocyte in stage III; os: ovisac; ov: ovary; tr: tracheole.

**Figure 2** – A–C: *Myrmecodesmus hastatus* ovary; D: histological section of *M. hastatus*. (A) Ovarian positioning and general structure; (B) detail of the ovary in close contact with the fat body; (C) detail of the irregular surface of oocytes; (D) oocyte distribution.

em: external membrane; fb: fat body; oo: oocytes; ov: ovary; tr: tracheoles.

**Figure 3** – A, C and D: *Telonychopus klossae* ovary; B: histological section of *T. klossae* ovary. (A) Ovarian general structure and oocytes in different development stages, clustered by a membrane; (B) distribution of paired ovaries; (C) intact ovisac and micropyle features; (D) oocytes in different development stages, grouped by a membrane.

em: external membrane; fb: fat body; oo: oocytes; os: ovisac; ovi: oviduct; tr: tracheoles; arrows in C: micropyle.

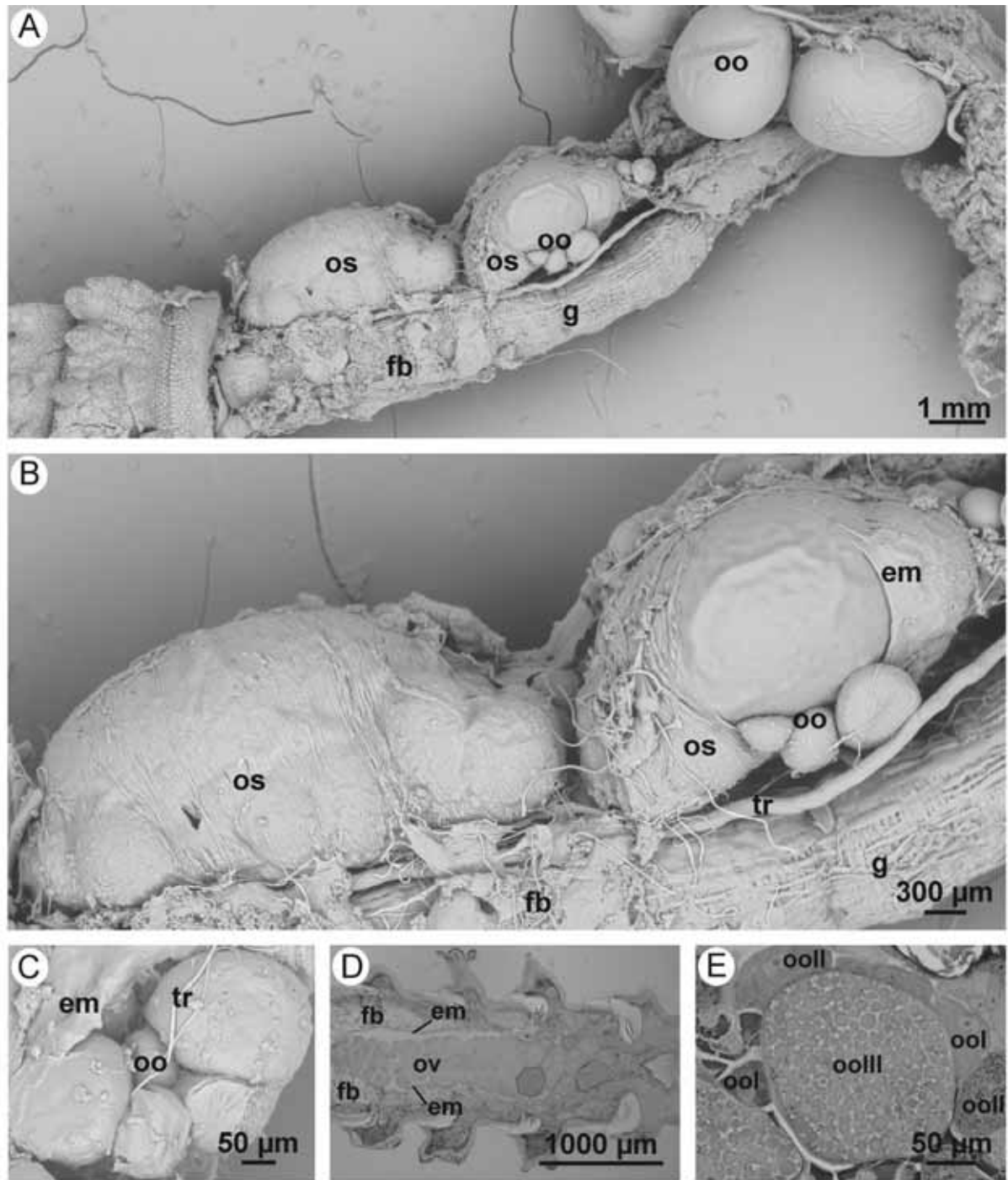


Figure 1

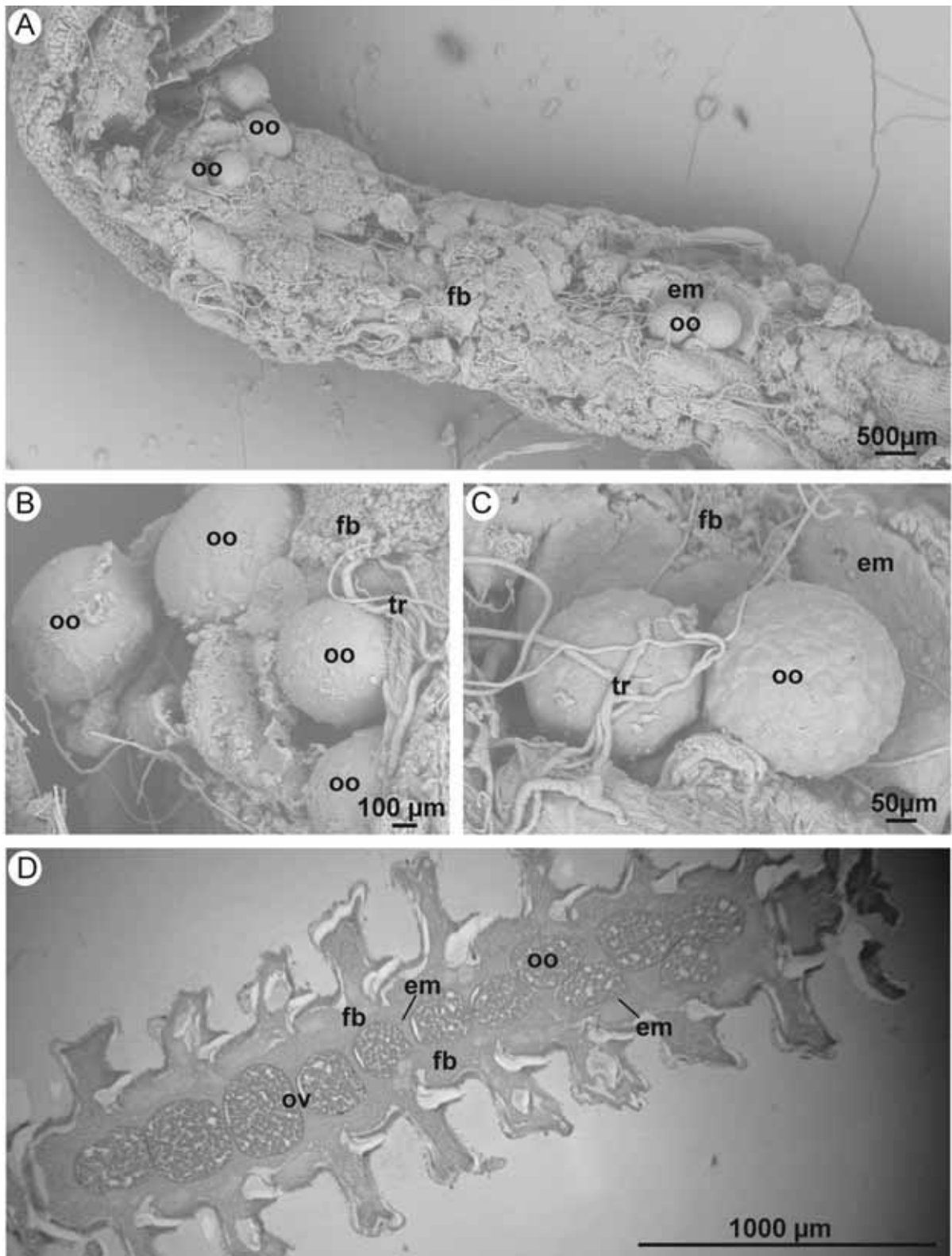


Figure 2

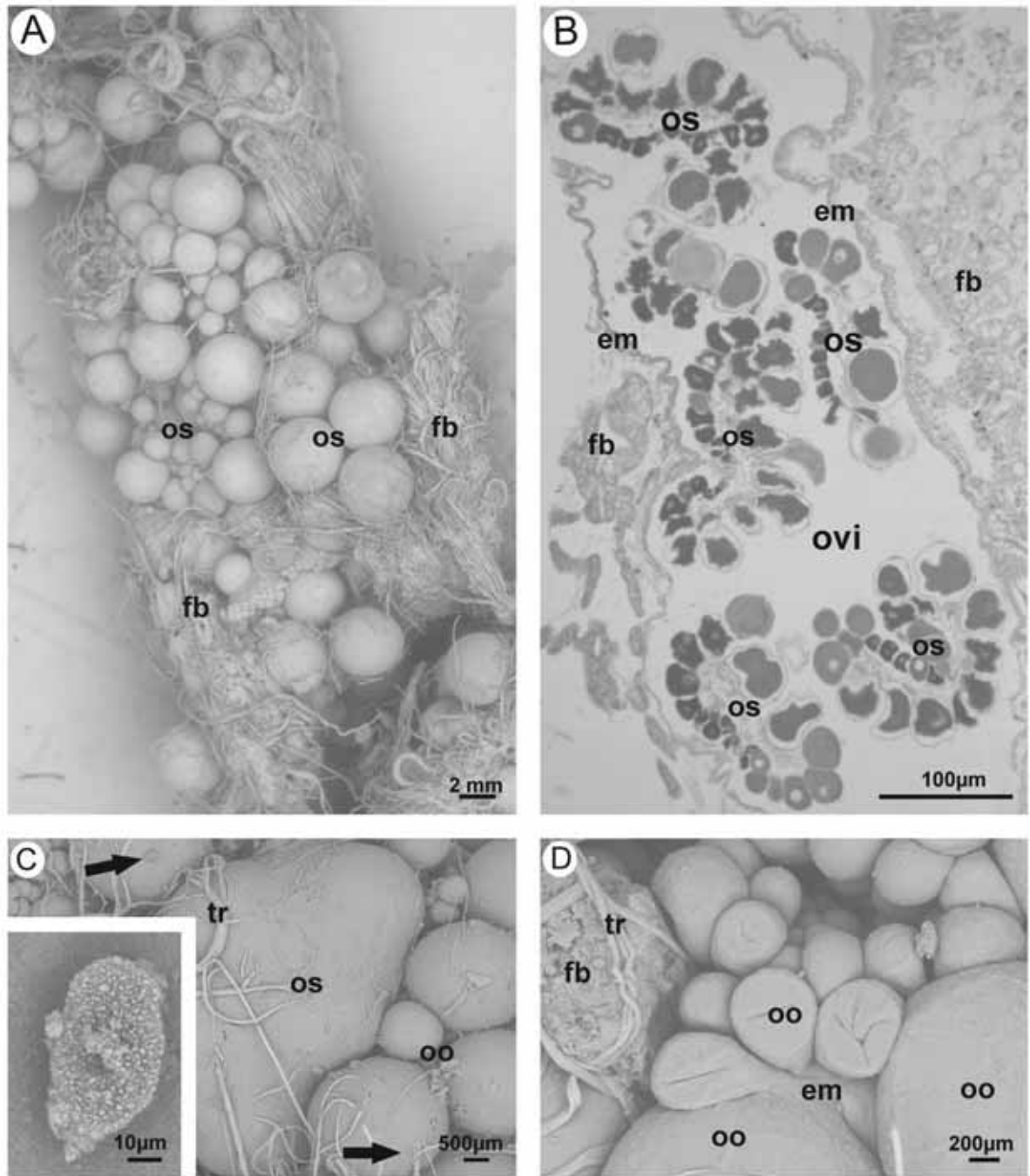


Figure 3

**Oogenetic cycle and reproductive strategies in two species of millipede  
(Diplopoda) from Pantanal of Brazil**

Tamaris Gimenez Pinheiro<sup>1</sup>, Marinêz Isaac Marques<sup>2</sup>, Leandro Dênis Battirola<sup>3</sup> e  
Carmem Silvia Fontanetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil, 13506-900.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Instituto de Biociências, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, 78060-900.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Sinop, Mato Grosso, Brasil, 78557-267

\* Author for correspondence: Carmem Silvia Fontanetti. UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia. Rio Claro, SP, Brazil, CEP 13506-900. Telephone: 55 19 3526 4139. E-mail: fontanet@rc.unesp.br.

## Resumo

Os diplópodos desenvolvem diversas estratégias comportamentais, fisiológicas e reprodutivas para suportar as alterações cíclicas do regime hídrico em áreas inundáveis. Com isso, considerando a dependência desses animais aos ambientes úmidos e a sua alta sensibilidade às mudanças ambientais, este estudo visou: i) descrever o ciclo ovogenético de *Poratia salvator* e *Myrmecodesmus hastatus* (Polydesmida, Polydesmidae), caracterizando o ciclo reprodutivo das mesmas durante os quatro períodos sazonais da região norte do Pantanal de Mato Grosso; ii) verificar a relação entre a pluviosidade média e o desenvolvimento dos ovócitos dessas espécies, discutindo o possível desenvolvimento de adaptações reprodutivas à variação hídrica sazonal desse ambiente alagável. As coletas ocorreram trimestralmente, de dezembro de 2009 a janeiro de 2012, na região norte do Pantanal de Mato Grosso, Brasil, contemplando nove períodos sazonais, visto que na seca de 2011 nenhum indivíduo de ambas as espécies foi amostrado. Todo material foi dissecado, fixado, emblocado e processado para estudo histológico. Os ovócitos, nos três estágios de desenvolvimento, foram contabilizados para posterior análise. Em todos os períodos sazonais ocorreram fêmeas com ovócitos em estágio III. Entretanto, o período da vazante foi o que apresentou a menor frequência relativa de fêmeas com ovócitos nesse estágio de desenvolvimento e o menor número médio de ovócitos vitelogênicos. O maior número médio de ovócitos vitelogênicos para *P. salvator* e para *M. hastatus* foi registrado nos períodos de seca e enchente, respectivamente. Os períodos de enchente e cheia foram os que apresentaram a maior frequência absoluta de fêmeas com ovócitos vitelogênicos e a maior porcentagem de fêmeas com os maiores valores de ovócitos em estágio III. Houve correlação negativa fraca entre a pluviosidade média e o número médio de ovócitos, e entre o comprimento total e o número de ovócito em estágio III. Dessa forma, pode-se afirmar que as espécies reproduzem-se continuamente durante o ano, com um incremento em sua reprodução nos períodos de enchente e cheia. Como este último período é bastante crítico, por provocar uma maior mortalidade dos juvenis devido à alta pluviosidade, os períodos seguintes (vazante e seca) são afetados, caracterizando-se como os de menor número de fêmeas reprodutivamente viáveis.

**Palavras-chave:** milípedes, precipitação, reprodução, sazonalidade.

**Abstract**

Millipedes have evolved a variety of behavioral, physiological and reproductive strategies to adapt to environments with strong seasonality, including seasonally flooded habitats. Considering these adaptations along with their extreme sensibility to microenvironmental conditions, this study aims: i) describing the oogenetic cycle in two species of millipede, *Poratia salvator* and *Myrmecodesmus hastatus* (Polydesmida, Polydesmidae), characterizing their reproductive cycle during the four seasons of the northern region of the Pantanal of Mato Grosso; and ii) examining the relationship between mean precipitation and oocyte development, in order to discuss the evolutionary adaptations of these species to the cyclical flooding of the Pantanal. The sampling occurred every three months from December 2009 to January 2012 in northern region of the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. Individuals were dissected and fixed for histological study. Oocytes in three developmental stages were counted for comparisons with mean precipitation and season. Oocytes in stage III were found throughout the year. However, during low water period had the lowest frequency of oocytes in stage III, while the greatest frequencies were in the dry season in *P. salvator* and the high water for *M. hastatus*. The flood and high water periods, however, had the greatest absolute numbers of females with vitellogenic and the highest percentage of females with the highest values of oocytes in stage III. The correlation was weak between precipitation and number of oocytes as well as body length and number of oocytes in stage III. Thus, females reproduce throughout the year, but with greater reproduction during flood and high water seasons. As these last seasonal periods are quite critical for causing higher mortality of juveniles due to high precipitation, the following periods (low water and dry season) are affected, characterized as the low number of reproductively viable females.

**Key words:** millipedes, precipitation, reproduction, seasonality

## Introduction

Floodplain forests and wetlands are among the world's most productive habitats (MARX et al., 2012). These environments are fundamental for a variety of ecological processes and productivity as well as important influences on species distributions and soil nutrient dynamics (JUNK et al., 1989, POFF et al., 1997, PAZ et al., 2011). Additionally, seasonally flooded regions, such as the Brazilian Pantanal, play an important role in the maintenance of diversity, due to the mosaic of habitat types, the dynamics of flooding and the associated variety of niches (ALHO, 2008).

Variation in the duration and magnitude of flooding and dry periods are very important for the fauna of the Pantanal because the flooding may often cover much of the vegetation, changing community structure, populations size and phenology of organisms that develop there. When dry periods are prolonged, resource limitation can follow and limit populations (ALHO; SILVA, 2012).

Millipedes are very sensitive to environmental changes and, in areas prone to flooding, these organisms develop survival strategies to tolerate of cyclical water regime as observed in Amazon (ADIS, 1997, ADIS et al., 1996) and Pantanal (ADIS et al., 2001, BATTIROLA et al., 2009). In the Pantanal of Mato Grosso, *Plusioporus salvadorii* Silvestri, 1895 (Spirostreptida, Spirostreptidae), *Pantanalodesmus marinezae* Hoffman, 2000 (ADIS et al., 2001) and species of the order Polyxenida (BATTIROLA et al., 2009) survive by migrating vertically to tree trunks when flooding occurs.

In addition to behavioral and physiological adaptations to flooding, millipede life cycles have also adapted to the alterations in their natural habitats, indicating the wide variety of life history found in this group (HOPKIN; READ, 1992, PINHEIRO et al., 2009, 2011, MARX et al., 2012). Some large millipedes in temperate regions are relatively long-lived, surviving 2 – 11 years, while in tropical regions, lifespan usually does not exceed three years (HOPKIN, READ, 1992, MINELLI, GOLOVATCH, 2001). On the other hand, small tropical species may have annual life cycles, in which maturation may take place in as little as five months like in *Poratia obliterata* (Kraus, 1960) (ADIS et al., 2000; BERGHOLZ, 2007), a species that occurs in flooded forests of the Amazon region, and *Poratia salvator* Golovatch & Sierwald, 2001 (both Polydesmida, Pyrgodesmidae) (PINHEIRO et. al., 2009, 2011), a parthenogenetic species object of this study.



Very little, in fact, is known about millipede oogenetic cycle and especially reproductive dynamic of this animal class, being possible to highlight the manuscripts of Warburg and Gealekman (2000) with *Catamicrophyllum caifanum* Verhoeff, 1920 (Julida, Julidae) and Vohland and Adis (1999) with Amazonian species *Pycnotropis tida* (Chamberlin, 1941) (Polydesmida, Aphelidesmidae).

Considering this lacuna, this study aims examining the millipede reproductive cycle in the seasonally flooded Pantanal of Mato Grosso, Brazil. Specifically, i) describing the oogenetic cycle in two species of millipede, *Poratia salvator* and *Myrmecodesmus hastatus* (Schubart, 1945) (Polydesmida, Polydesmidae); and ii) examining the relationship between mean precipitation and oocyte development, in order to discuss the evolutionary adaptations of these species to the cyclical flooding of the Pantanal.

## **Methods**

### **Study area and collecting**

Collections were carried out every three months from December 2009 to January 2012 in the Parque Baía das Pedras, approximately 40 km from city of Poconé (56°25'17,89" W and 16°29'49,46" S), in the northern region of the Pantanal, in the state of Mato Grosso, Brazil. The precipitation measurements were taken from nearby, at the Estação Meteorológica de Porto Cercado, under responsibility of the Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Centro Regional do Nordeste/Sistema Nacional de Dados Ambientais (INPE/CRN/SINDA).

Seasons were classified in four well-defined periods according to Heckmann (1998): flood period (October – December), high water (January – March), low water (April – June) and dry season (July – September). To calculate the precipitation average all data were grouped by months corresponding to each seasonal period of years, as follows: i) flood period: corresponded to the months October, November and December of 2009, 2010 and 2011; ii) high water: comprising January, February and March of 2010, 2011 and January 2012; iii) low water: April, May and June of 2010 and 2011; and iv) dry season: July, August and September of 2010 and 2011.

During this study, the precipitation varied among years about four times more in 2010 than 2011. Grouping the data for each seasonal period sampled over years 2009 to 2012 was observed that the flood period had lower precipitation (710 mm) followed by high water (1094 mm), dry season (1121 mm) and low water (1616 mm).

Millipedes were collected in decomposing organic material from under treefalls and in leaf litter by active searching. Each field campaign comprised four hours each day for a minimum of three days. Upon capture, animals were kept in plastic containers with a small amount of organic substrate taken from where the animal was collected. Animals were then transported in a styrofoam cooler to the Laboratório de Ecologia e Taxonomia de Artrópodes (LETA) of the Instituto de Biociências of the Universidade Federal de Mato Grosso, in city of Cuiabá, where they were fixed for histological study. At a later date, they were sent to the Laboratório de Histologia in the Departamento de Biologia of the Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP in the city of Rio Claro, in the state of São Paulo.

### **Laboratory procedures**

The adult females of *P. salvator* and *M. hastatus* were measured (length) and, as they have a small body size (4.0 – 6.0 mm), they were sacrificed by fast freezing and then fixed entirely, except for the body extremities (head and telson), which were removed to insure penetration of the fixatives. They were then fixed in a Bouin alcohol, paraformaldehyde and calcium formalin solution.

After fixation, they were dehydrated in alcohol series for 30 min at each concentration (70, 80, 90 and 95%) and then placed in resin for at least 24 h, followed by resin with catalyst. Upon polymerization, the material was sectioned in 5 µm thick longitudinal sections using a microtome, hydrated and then mounted on slides, five per female, each with eight sections.

After drying the slides, they were prepared using standard histological and histochemical procedures. Sections that had germinative cells were photographed under a microscope using Leica IM50 version 5 Release 220. All oocytes in three development stages were counted in the photographs. For the analyses, assumed the largest number obtained for each of these stages by female. Development stages were identified following Camargo-Mathias et al. (1998) modified by Pinheiro et al. (submitted).

## Data analysis

The number of oocytes in each stages of development was compared among the four seasonal periods by a Kruskal-Wallis non-parametric test. The *a posteriori* test employed was Kolmogorov-Smirnov.

The absolute and relative frequencies were calculated for oocytes in stage III to determine which seasonal period had a greater number and percentage of females with vitellogenic oocytes, characterizing the reproductive period. The correlation between precipitation and oocyte production was tested by Spearman correlation test. Also, to verify which seasonal period presented females with the highest numbers of vitellogenic oocytes, these were grouped into five intervals (class of numbers) which contemplated the minimum and maximum values recorded. After that, the percentage of females of each species for each class of numbers was calculated grouped under four annual seasons. We carried out analysis using Systat 11 with statistical significance at  $\alpha = 0.05$ . All averages are presented together with the standard deviation (SD).

## Results

### *Poratia salvator*

Of the 132 females collected, 63 were found during flood period, 43 during high water, 22 during low water and four during the dry period. The average number of oocytes in stage I was 29.85 (SD = 20.06; min = 0; max = 101), to oocytes in stage II was 6.31 (SD = 4.75; min = 0; max = 24) and to oocytes in stage III was 4.85 (SD = 3.69; min = 0; max = 16).

During low water season, females had more oocytes in stage I, followed by high water, flood and dry periods ( $H = 10.15$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0.02$ ). Oocytes in stage II were more abundant during high water, followed by low water, flood and dry seasons ( $H = 11.12$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0.01$ ). Oocytes in stage III were more abundant during the dry period, followed by flood period, high water and low water ( $H = 17.84$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0.05$ ) (Figure 1A-C). The Kolmogorov-Smirnov test enabled the identification of differences in the number of oocytes in stage I between flood and low water periods ( $P < 0.01$ ). For oocytes in stage II the difference occurs between high water and flood periods ( $P = 0.01$ ), and for oocytes in stage III the significant differences occurs between low water and the other seasonal periods like high water ( $P = 0.04$ ), flood ( $P < 0.01$ ) and dry season ( $P = 0.04$ ).

Of the 132 females analyzed, 115 (87%) had oocytes in stage III, most of which ( $n = 57$ ) were counted during flood period, followed by high water ( $n = 39$ ), low water ( $n = 15$ ) and dry season ( $n = 4$ ) (Figure 2).

There was a positive but weak correlation between the mean number of oocytes in stage I and mean precipitation (Spearman correlation = 0.07) (Figure 3). As the average number of oocytes in stage II, there was also a weak negative correlation with the precipitation (Spearman correlation = -0.57) (Figure 3). The mean number of oocytes in stage III showed very weak negative correlation, almost null, with precipitation (Spearman correlation = -0.10) (Figure 3).

With respect to cluster the oocytes in stage III in class of numbers, it was observed that the low water period had the highest percentage of females with the lowest interval of number and the flood period showed the vitellogenics oocytes in the greater class of number (Figure 4A).

Average length of females was 4.75 (SD = 0.31; min = 4 mm; max = 5.5 mm) and was independent of season ( $H = 2.43$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0.49$ ).

### ***Myrmecodesmus hastatus***

Of the 120 females collected, 32 were during flood, 46 at high water, 35 at low water and seven during the dry period. The average number of oocytes in stage I was 31.45 (SD = 18.63; min = 0; max = 84), to oocytes in stage II was 11.60 (SD = 8.51; min = 0; max = 49) and to oocytes in stage III was 6.21 (SD = 5.39; min = 0; max = 19).

During low water season, females had more oocytes in stage I, followed by flood period, dry season and high water period ( $H = 14.54$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0.01$ ). Oocytes in stage II were more abundant during low water, followed by flood period, high water and dry seasons ( $H = 4.06$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0.26$ ). Oocytes in stage III were more abundant during the high water period, followed by flood, dry season and low water ( $H = 35.08$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0.05$ ) (Figure 1A-C). The Kolmogorov-Smirnov test enabled the identification of differences in the number of oocytes in stage I between low water and high water periods ( $P < 0.01$ ). For oocytes in stage III the difference occurs between low water and the others seasonal periods like high water ( $P < 0.05$ ), flood ( $P < 0.05$ ) and dry season ( $P = 0.05$ ).

Of the 120 females analyzed, 80 (67%) had oocytes in stage III, mostly found during high water (n = 42). The remainder was found during flood (n = 24), low water (n = 9) and dry season (n = 5) (Figure 2).

There was a negative but weak correlation between the mean number of oocytes in stage I and mean precipitation (Spearman correlation = -0.05) (Figure 3). As the average number of oocytes in stage II, there was a strong negative correlation with precipitation (Spearman correlation = -0.73) (Figure 3). The mean number of oocytes in stage III showed weak negative correlation with mean precipitation (Spearman correlation = -0.30) (Figure 3).

With respect to cluster the vitellogenics oocytes of *M. hastatus* in class of numbers, it was observed that the low water period had the highest percentage of females with the lowest interval of number and the flood period showed the oocytes in stage III in the greater class of number (Figure 4B).

Average length of females was 5.64 (SD = 0.46 mm; min = 4.6 mm; max = 7 mm), and length varied among seasons (H = 16.82; gl = 3; P < 0.01). The total length of the high water females (mean = 5.81 mm; minimum = 4.6 mm; max = 6.6 mm) was different of the flood females (mean = 5.45 mm; minimum = 5 mm; maximum = 7 mm; P < 0.01) and low water females (mean = 5.63 mm; minimum = 5.0 mm; max = 6.1 mm; P = 0.01). However, we observed a very weak positive correlation between the average length of the females and the mean number of oocytes in stage III (Spearman correlation coefficient = 0.05).

## Discussion

Oocyte classification into three stages in studied species is efficient and certain, since parameters such as cell size, cytoplasmic aspect and chorio development are well defined and have been described for other Brazilian species of millipedes (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998, FONTANETTI et al., 2010, ZIRONDI et al., 2012, FONTANETTI et al., 2012). However, the number of development oocytes stages in millipede can vary widely (NAIR, 1981, NADARAJALINGAM, SUBRAMONIAN, 1984, YAHATA, MAKIOKA, 1994, WARBURG, GEALEKMAN, 2000). Such variation usually indicates several episodes of reproduction per year and lifespans of more than one year (WARBURG, GEALEKMAN, 2000).

Regardless of the number of developmental oocytes stages, some species of millipedes synchronize oocyte maturation such that there are well-defined periods of

oviposition (NEWPORT, 1841). This is common among temperate species that reproduce during periods of mild temperatures (NEWPORT, 1841, BLOWER, 1970, HEATH et al., 1974, BERCOVITZ, WARBURG, 1985, CRAWFORD et al., 1987, IATROU, STAMOU, 1990).

In this study, females with oocytes in stage III occur in all seasonal periods, suggesting year-round continuous reproduction. While reproduction may occur all year long, there seem to be periods of greater and lesser reproductive rates. For example, during low water period the frequency of oocytes in stage III was lower than the other seasons. This trend may be due to the greater than usual precipitation and the tendency for mean precipitation and oocytes in stage III frequency to be negatively correlated. Both species tended towards greater frequencies of oocytes in stage III during the dry period. Surprisingly, during the dry season in this study, atypical extremes of precipitation occurred (2,336 mm).

Our data presented herein, and in Pinheiro et al. (2009), show that the life cycle in *P. salvator* is around 150 days, or two seasons. Thus, the species is found all year round and reproduces continually, with greater reproduction during flood and high water periods. Apparently, greater precipitation is associated with greater mortality, especially of juveniles and thus population declines follows periods of rainfall and the following periods (low water and dry season) are affected by population decline and, consequently, as the least number of reproductively viable females.

To ensure the maintenance of their populations against the high precipitation these species seems to have a reproductive strategy of resistance of eggs to flood. This idea is supported by the evidence that females of low water had the highest average number of oocytes in stages I and the smaller number of oocytes at stage III, demonstrating the non-maturation of their germ cells and, hence, the low rates of reproduction. These females developed from eggs that survived the flood, so they were newly emerged (reproductively immature adult). With the dry season of 2010 having unusual precipitation rate, it is possible that females anticipated conditions for reproduction as a consequence.

Similar patterns occurred in *M. hastatus*. However, how this species has eight developmental stages (in comparison with seven in *P. salvator*), it can have an increased life cycle and reproduction concentrated during the high water period. This is supported by the larger frequency of females with greater number of vitellogenic oocytes at that period. Mortality in juveniles may be reduced due to them remaining in

the nest until the third developmental stage (PINHEIRO, pers. obs.) after which they may tolerate extremes conditions of humidity and temperature. This is in contrast to *P. salvator*, whose first stage juveniles are already active outside the nest and therefore more susceptible to climatic extremes (PINHEIRO et al., 2009).

In seasonally flooded areas in Nigeria, female *Aporodesmus zaria* Hoffman, 1967 (Polydesmida, Cryptodesmidae) survive the dry period and oviposition follows the first rainfalls (LEWIS, 2001). In contrast, *P. tida* (in flooded forests in the Amazon) breeding is synchronized to occur at the end of the high water so that young (more susceptible to rainfall than adults) may develop on dry land (VOHLAND; ADIS, 1999). Clearly these breeding strategies, and those described here, indicate that millipedes have a wide variety of life histories adapted to the each particular environment (HOPKIN; READ 1992; PINHEIRO et al., 2009; 2011, MARX et al., 2012).

In addition, seasonality is extremely important for smaller millipedes (VOHLAND; ADIS, 1999). In Polydesmida, nest construction, molt chambers and deeper, more humid nests, may all be local adaptations to avoid temperature and humidity extremes (LEWIS, 1971 a, b; CRAWFORD; MATLACK, 1979; CRAWFORD et al., 1987; BATTIROLA et al., 2009). Perhaps this explains why no individual was found during the dry season of 2011, with < 4 mm of mean precipitation.

The larger *M. hastatus* females had a greater number of oocytes in stage III than *P. salvator*, which may merely be due to larger body size such as in *C. caifanum* (WARBURG; GEALEKMAN, 2000). During the high water period the *M. hastatus* largest females were found that also suggests that females concentrate reproduction at that time.

Considering the information obtained from this study and associating them with data available in research Battirola et al. (2009) and Pinheiro et al. (2009, 2011) it can be stated that the two species studied appear to have adapted to seasonally flooded environments by adjusting their life cycle to flood and high water periods of the Pantanal of Mato Grosso, which favoring the development of adults, since they require environments with high levels of humidity (PINHEIRO et al., 2011). Thus, they optimize their reproduction by increasing the juveniles number and therefore the chances of surviving and reaching adulthood in subsequent periods.

## Acknowledgments

The authors thank FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*) for the scholarship for T. G. Pinheiro. Thanks to CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) and INAU (*Instituto Nacional de Áreas Úmida*) (INAU/MCT/CNPq/UFMT) and to PRONEX/2009 (FAPEMAT/CNPq) for financial support. James J. Roper translated this text from the original Portuguese.

## Literature Cited

ADIS, J. Terrestrial invertebrates: Survival strategies, group spectrum, dominance and activity patterns, p. 299-371. In JUNK, W. E. (Ed.). **The Central Amazonian floodplain. Ecology of a pulsing system**. Berlin: Springer, 1997. 525p.

ADIS, J., GOLOVATCH, S. I., HAMANN, S. Survival strategy of the terricolous millipede *Cutervodesmus adisi* Golovatch (Fuhrmannodesmidae, Polydesmida) in a blackwater inundation forest of Central Amazonia (Brazil) in response to the flood pulse. In GEOFFROY, J.-J., MAURIES, J.-P., NGUYEN DUY-JACQUEMIN, M. (Eds.). **Acta Myriapodologica**. Paris: Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle, 1996. 682p.

ADIS, J., GOLOVATCH, S. I., LARS, W.; HANSEN, B. On the identities of *Muyudesmus obliteratus* Kraus, 1960 versus *Poratia digitata* (Porat, 1889), with first biological observations on parthenogenetic and bisexual populations (Diplopoda: Polydesmida: Pyrgodesmidae) In: WYTWER, J.; GOLOVATCH, S.I. (Eds.). **Progress in studies on Myriapoda and Onychophora**. Warszawa: Fragmenta Faunística (Supplement), 2000. n. 43. XIV+396p.

ADIS, J; MARQUES, M. I.; WANTZEN, K. M. First observations on the survival strategies of terricolous arthropods in the northern Pantanal wetland of Brazil. **Andrias**, v. 15, p. 127-128, 2001.

ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68(4, Suplemento), p. 957-966, 2008.



ALHO, C. J. R.; SILVA, J. S. V. Effects of severe floods and droughts on wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil) - A review. **Animals**, v.2, p. 591-610, 2012.

BATTIROLA, L. D.; MARQUES, M. I.; ROSADO-NETO, G. H.; PINHEIRO, T. G.; PINHO, N. G. C. Vertical and time distribution of Diplopoda (Arthropoda, Myriapoda) in a monodominant forest in Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Zoologia**, v. 26, p. 479-487, 2009.

BERCOVITZ, K; WARBURG, M. R. Developmental patterns in two populations of the millipede *Archispirostreptus syriacus* (De Saussure) in Israel (Diplopoda). **Bijdr. Tot Dierk.**, v. 55, p. 37-46, 1985.

BERGHOLZ, N. G. R. **Ecological traits and genetic variation in Amazonian populations of the Neotropical millipede *Poratia obliterata* (Kraus, 1960) (Diplopoda: Pyrgodesmidae) (Brazil)**. Invertebrate Ecology & Conservation Monographs, Sofia: Pensoft Publishers, 2007. 197p.

BLOWER, J.G. The millipedes of a Cheshire wood. **Journal of Zoology, London**, v. 160, p. 455-496, 1970.

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

CRAWFORD, C. S.; MATLACK, M. C. Water relations of desert millipede larvae, larva-containing pellets, and surrounding soil. **Pedobiologia**, v. 19, p. 48-55, 1979.

CRAWFORD, C. S.; BERCOVITZ, K.; WARBURG, M. R. Regional environments, life-history patterns and habitat use of Spirostreptid millipedes in arid regions. **Zoological Journal of the Linnean Society of London**, v. 89, p. 63-88, 1987.

FONTANETTI, C. S.; SOUZA, T. da S.; CALLIGARIS, I. B.; BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. **Animal Biology**, v. 60, p. 467-478, 2010.

FONTANETTI, C.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. da S.; IAMONTE, M. Ultrastructure of oocytes of the *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptida, Spirostreptidae): a potential urban centers plague.. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1486–1491, 2012.

HEATH, J. BOCOCK, K. L.; MOUNTFORD, M. D. The life history of the millipede *Glomeris marginata* (Villers) in North-West England. **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 32, p. 433-462, 1974.

HECKMAN, C. W. **The Pantanal of Poconé. Biota and ecology in the northern section of the world's largest pristine wetland**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 622p.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 1992. 232 p.

IATROU, G. D.; STAMOU, G. P. Studies on the life cycle of *Glomeris balcânica* (Diplopoda, Glomeridae) under laboratory conditions. **Pedobiologia**, v. 34, p. 173-181, 1990.

IATROU, G. D.; STAMOU, G. P. The life cycle and spatial distribution of *Glomeris balcania* (Diplopoda, Glomeridae) in an evergreen-sclerophyllous formation in northern Greece. **Pedobiologia**, v. 35, p.1-10, 1991.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in riverfloodplain- systems. **Canadian Special Publications for Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 106, p. 110–127, 1989.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. G. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123 p.

LEWIS, J. G. E. The life history and ecology of the millipede *tymbodesmus falcatus* (Polydesmida: Gomphodesmidae) in northern Nigeria with notes on *Sphenodesmus sherobongensis*. **Journal of Zoology**, v. 164, p. 551-563, 1971a.

LEWIS, J. G. E. The life history and ecology of the three paradoxosomatid millipedes (Diplopoda: Polydesmida) in northern Nigeria. **Journal of Zoology**, v. 165, p. 431-452, 1971b.

LISON, L. **Histochimie et cytochimie animales**. Ganthiervillars: Éditeur – Imprimeur – Libraire, 1985. 842p.

MARX, M. T.; GUHMANN, P.; DECKER, P. Adaptations and predispositions of different middle European arthropod taxa (Collembola, Araneae, Chilopoda, Diplopoda) to flooding and drought conditions. **Animals**, v. 2, p. 564-590, 2012.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Edgar Blucher; Campinas: FUNCAMP, 1980. 71p.

MINELLI, A.; GOLOVATCH, S. I.. Myriapods. **Encyclopedia of Biodiversity**, v. 4, p. 291-303, 2001.

NADARAJALINGAM, K.; SUBRAMONIAN, T. Oogenesis in a millipede *Spirostreptus asthenes* (Myriapoda, Diplopoda). **Zoologischer Anzeiger**, v. 212, p. 229 - 239. 1984.

NAIR, V. S. K. Oocyte developmental and vitellogenesis in *Jonespeltis splendidus* (Myriapoda: Diplopoda). **Journal of Animal Morphology and Physiology**, v. 28, p. 186-194, 1981.

NEWPORT, G. The Bakerian lecture: on the organs of reproduction, and the development of the Myriapoda. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 31, p. 99 – 130, 1841.

PAZ, A. R da; COLLISCHONN, W.; TUCCI, C. E. M. Large-scale modelling of channel flow and floodplain inundation dynamics and its application to the Pantanal (Brazil). **Hydrological Process**, v. 25, p. 1498-1516, 2011.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied** . 4. ed., London: J&A. Churchill, 1985. 998 p.

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; BATTIROLA, L. D. Life cycle of *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). **Zoologia**, v. 26, n. 4, p. 658–662, 2009.

PINHEIRO, T. G.; BATTIROLA, L. D.; MARQUES, M. I. Fertility tables of two populations of the parthenogenetic species *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 2, p. 501-510, 2011.

POFF, N. L.; ALLAN, J. D.; BAIN, M. B.; KARR, J. R.; PRESTEGAARD, K. L.; RICHTER, B. D.; SPARKS, R. E.; STROMBERG, J. C. The natural flow regime: a paradigm for river conservation and restoration. **Bioscience**, v. 47, n. 11, p. 769–784, 1997.

STEARNS, S. C. Life-history: a review of the ideas. **The Quarterly Review of Biology**, v. 51, n. 1, p. 3-47, 1976.

VOHLAND, K.; ADIS, J. Life history of *Pycnotropis tida* (Diplopoda: Polydesmida: Aphelidesmidae) from seasonally inundated forest in Amazonia (Brazil and Peru). **Pedobiologia**, v. 43, p. 231-244, 1999.

WARBURG M. R.; GEALEKMAN, O. Ovarian structure and oogenetic cycle in the millipede *Catamicrophyllum caifanum* (Diplopoda: Iulidae). **Journal of Zoology**, v. 250, p. 79-85, 2000.

YAHATA, K.; MAKIOKA, T. Phylogenetic implications of structure of adult ovary and oogenesis in the penicillate diplopod, *Eudigraphis nigricans*(Miyosi) (Diplopoda: Myriapoda). **Journal of Morphology**, v. 222, p. 223-230, 1994.

ZIRONDI M. C ; PINHEIRO, T. G. ; FONTANETTI, C. S. Ovarian morphology and oogenesis of *Leptodesmus dentellus* (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae) **Animal Biology**, p. 1-16, 2012.

## Figure Legends

**Figure 1** – Comparison between average number (confidence interval) of oocytes in three stages (I, II and III) of *P. salvator* and *M. hastatus* and mean precipitation in each seasonal period in the Pantanal of Mato Grosso, from December 2009 to January 2012.

**Figure 2** – Comparison of the number of females of *P. salvator* and *M. hastatus* with oocytes in stage III during the four seasons in the Pantanal of Mato Grosso, from 2009 – 2012.

**Figure 3** – Comparison of the number of oocytes in *P. salvator* and *M. hastatus* during the three development stages, with mean precipitation (mm) from December 2009 to January 2012.

**Figure 4** – Comparison of the proportion of females (A) *P. salvator* and (B) *M. hastatus* in class of numbers of oocytes in stage III during the four seasons in the Pantanal of Mato Grosso.

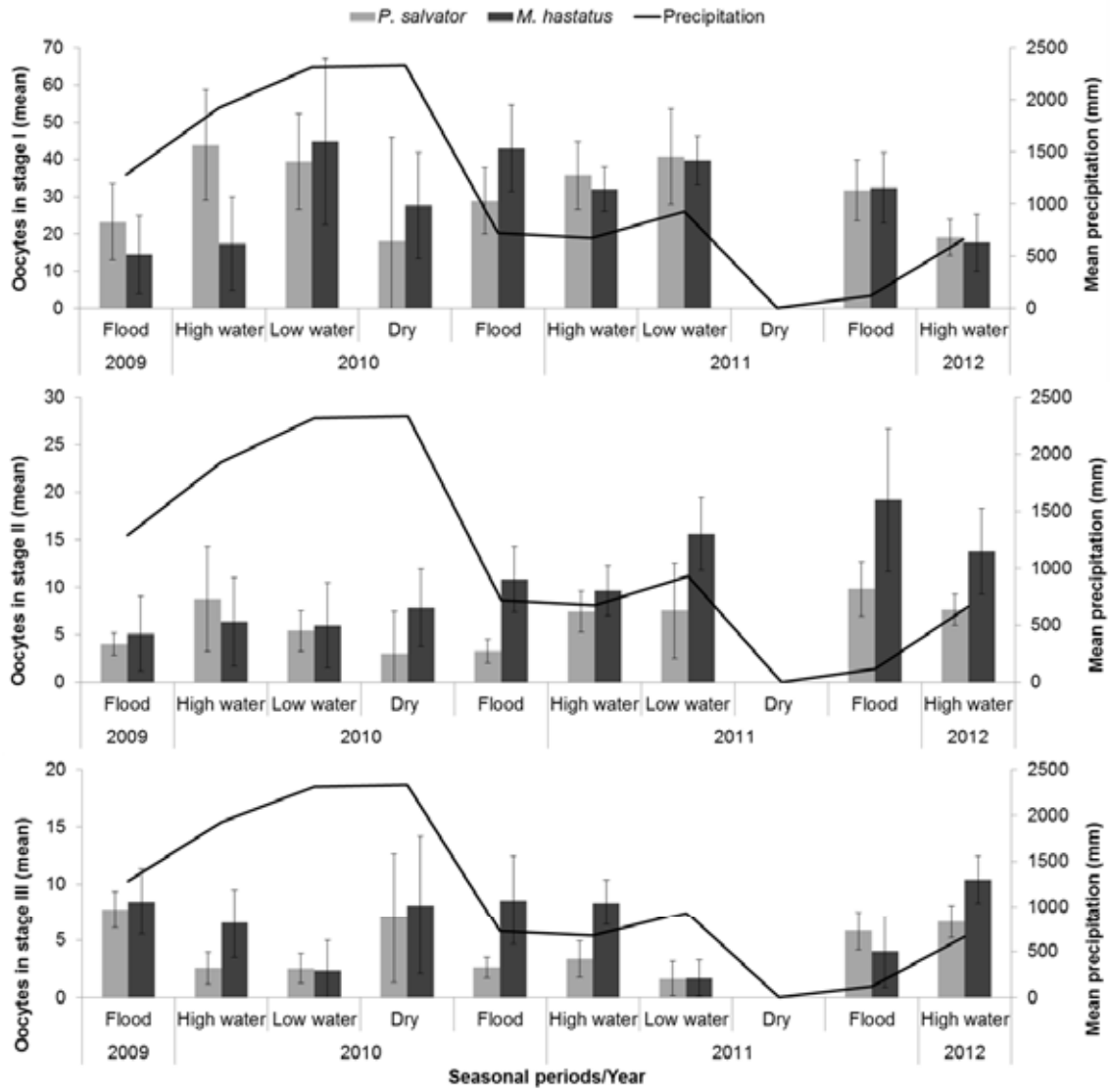


Figure 1

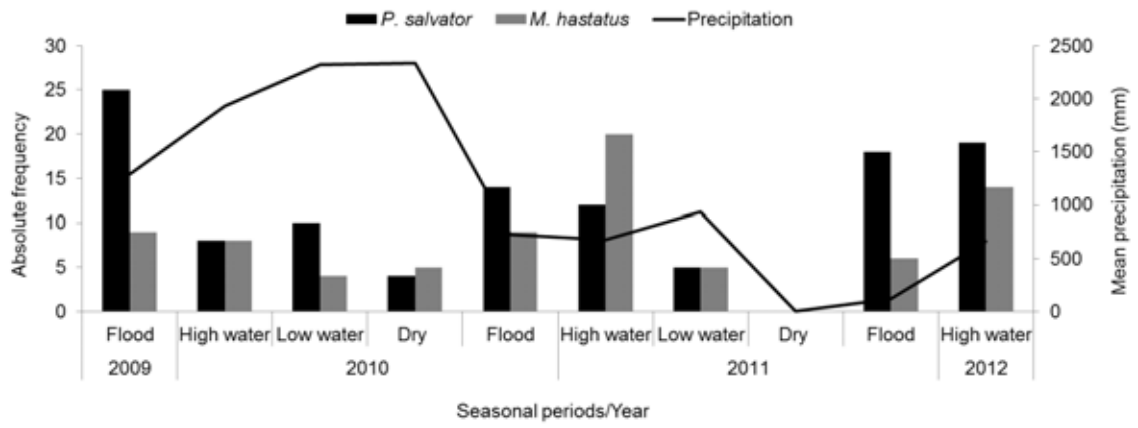


Figure 2

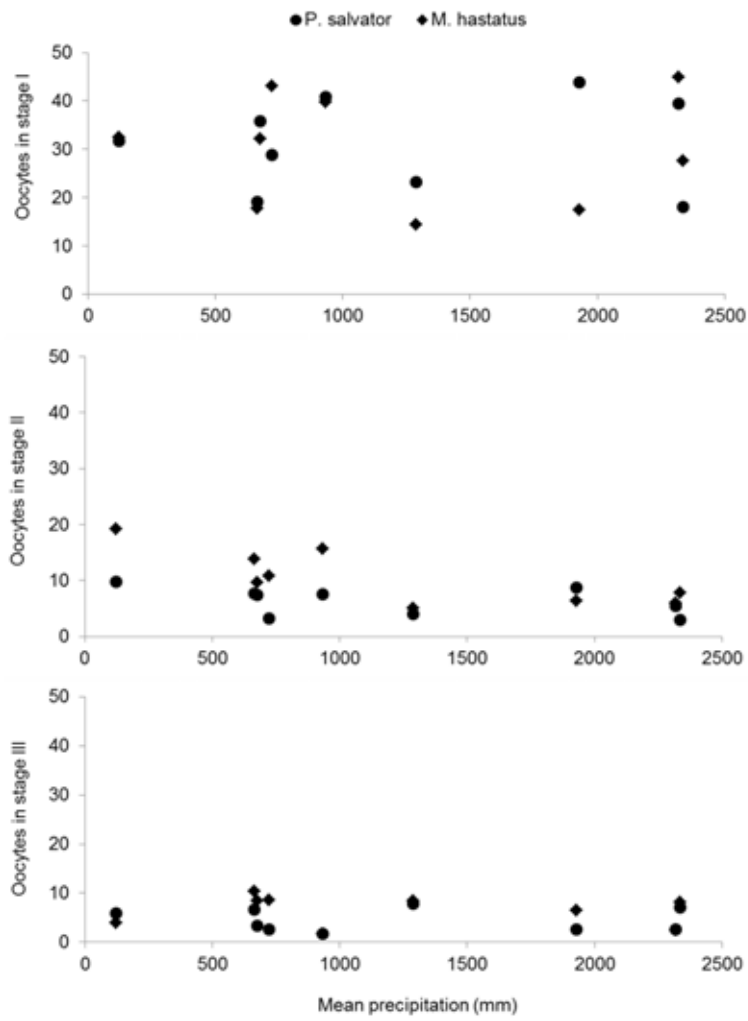


Figure 3



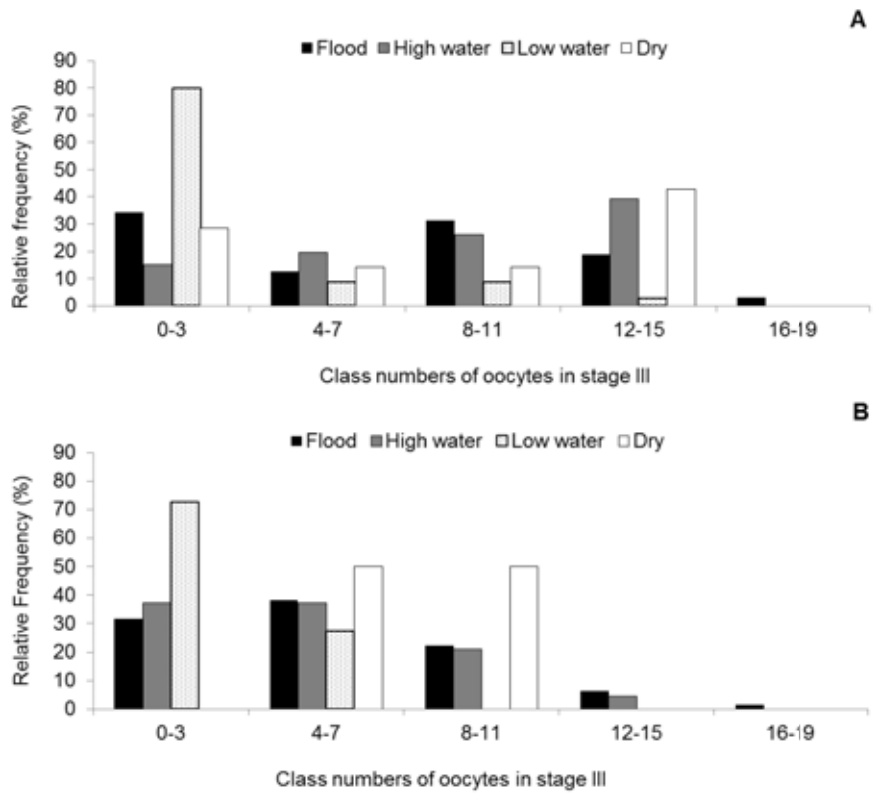


Figure 4

**Description of reproductive and molt behaviors in *Telonychopus klossae*  
Hoffman, 1965 (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae)**

Tamaris Gimenez Pinheiro<sup>1</sup>; Marinêz Isaac Marques<sup>2</sup> and Carmem Silvia Fontanetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil, 13506-900.

<sup>2</sup>UFMT (Universidade Federal de Mato Grosso), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Instituto de Biociências, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, 78060-900.

\* Author for correspondence: Carmem Silvia Fontanetti. UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia. Rio Claro, SP, Brazil, CEP 13506-900. Telephone: 55 19 3526 4139. E-mail: fontanet@rc.unesp.br.

## Resumo

Apesar da espécie *Telonychopus klossae* ter sido descrita há quase meio século, nenhum aspecto da sua biologia foi estudado. Assim, esta pesquisa objetiva descrever o comportamento reprodutivo e de muda da espécie, a fim de contribuir com o conhecimento sobre os Diplopoda da fauna brasileira. A espécie foi coletada por meio de busca ativa no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso, município de Cuiabá, estado de Mato Grosso. As coletas ocorreram trimestralmente, de dezembro de 2009 a janeiro de 2012, totalizando dez eventos de buscas. Foram coletadas 66 fêmeas, mas durante os meses de outubro de 2010, agosto de 2011 e janeiro de 2012, nenhum indivíduo foi amostrado. As fêmeas adultas foram dissecadas para verificação do desenvolvimento do ovário, o qual foi classificado como desenvolvido e não desenvolvido, conforme presença ou ausência de ovócitos visíveis. O conteúdo intestinal de um indivíduo em ecdise foi analisado. O comprimento, altura e tamanho da abertura das câmaras de muda encontradas foram medidos. Quarenta e cinco fêmeas apresentaram o ovário desenvolvido; os meses de dezembro de 2009, fevereiro e maio de 2010 e 2011 foram os que apresentaram as fêmeas com essas características; já para as fêmeas de dezembro de 2010 e novembro de 2011 registrou-se o ovário sem ovócitos desenvolvidos. Em duas, das dez buscas realizadas na área de coleta, foi possível observar o comportamento de construção de câmaras de muda agregadas, e em alguns casos construídas umas ao lado das outras; algumas se encontravam fortemente unidas com o substrato utilizado para a formação de sua parede; o comprimento médio das câmaras não variou. Constatou-se que os indivíduos ingerem o antigo exoesqueleto. O desenvolvimento completo de *T. klossae* é anual, com a espécie permanecendo inativa em câmaras de muda durante seis meses do ano (junho a novembro); sua reprodução se inicia em dezembro e se estende até maio.

**Palavras-chave:** Ecdise; milípedes; reprodução.

**Abstract**

While the millipede *Telonychopus klossae* has been known for nearly 50 years its biology remains little known. Here are described reproductive and molt behaviors to part fill in the biological knowledge gap of this millipede species and the Brazilian Diplopoda fauna. Animals were found in Cuiabá, Mato Grosso, campus of the Universidade Federal de Mato Grosso, in December 2009 – January 2012. A total of 66 females were collected. Adult females were dissected in order to examine the development of the ovaries. Intestinal content was studied in one molting adult individual. The circumference length and height of the molt chambers were measured. Forty five females had developed ovaries and were found in December 2009, February and May 2010 and 2011, while females found in December 2010 and November 2011 had undeveloped ovaries. Two events of construction of aggregates of chambers were observed, such that some were strongly connected to each other. After molt, the old exoskeleton is ingested. Complete development of *T. klossae* is annual, with the millipede remaining inactive for six months, from June to November, and reproduction begins in December and ends in May.

**Key words:** Ecdysis; millipedes; reproduction

## Introduction

With more than 150 recognized genera, the family Chelodesmidae is among the largest in the class Diplopoda. Central and west Africa, southeast Brazil and the Andes have the greatest species abundance in this family. Small species (adults < 10 mm long) are found in various places in the Neotropics, while larger species (~120 mm long) are found in mountains in southeastern Brazil. Due to wide variation in body structure and genitalia, the phylogenetic organization of species within the family is difficult (HOFFMAN et al., 1996). For example, the tribe Telonychopodini with small millipedes (< 70 mm) is very morphologically heterogeneous and its taxonomy has had more changes than any other in the family Chelodesmidae, which, with the most recent revision, has seven genera (PENA-BARBOSA, 2011). In this tribe, the genus *Telonychopus* Verhoeff, 1951 has only two described species, both of which come from the Brazilian state of Mato Grosso (HOFFMAN, 2000).

*Telonychopus klossae* Hoffman, 1965 was described from a holotype from Santo Antônio do Leverger, in the state of Mato Grosso. Paratypes come from the Chapada dos Guimarães, also in Mato Grosso, and since 1999 they have been found on the campus of the Universidade Federal de Mato Grosso, in Cuiabá, Mato Grosso (HOFFMAN, 2000). While the species was described in 1965, since then nothing has been published about its biology. Thus, the aim of this study was describe some aspects of reproductive and molt behaviors in *T. klossae*, to begin filling the lacunae about the class Diplopoda in Brazil.

## Methods

During 10 capture periods between December 2009 and January 2012, we collected specimens on the campus of the Universidade Federal de Mato Grosso in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. The specimens were found on tree-falls, leaf litter and other organic matter on the ground through active searching. Once captured, individuals were maintained in plastic pots with lids with a small amount of organic substrate. All animals collected were taken to the Laboratório de Ecologia e Taxonomia de Artrópodes (LETA) of the Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá.

Adult females were measured (length), sacrificed by rapid freezing and dissected under a stereomicroscope in sterile saline solution to remove the ovaries. Ovaries were classified as developed and undeveloped based on the presence of

visible oocytes. One individual in the process of ecdysis was also dissected and from which intestinal contents were extracted for analysis. When found in the field, molt chambers were collected and taken to the laboratory for measurement (circumference length and height).

The size of females was compared among months using ANOVA, in Systat 11, with a determined significance level ( $\alpha$ ) of 0.05. All averages are presented together with the standard error.

## Results

A total of 66 females were collected in the field, of which 45 had developed ovaries with visible oocytes. Developed ovaries were found in females of the months of December 2009 ( $n = 9$ ), February (20) and May (16) of 2010 and 2011. Undeveloped ovaries were found in December 2010 (13) and in November 2011 (6). No individuals were found in October 2010, August 2011 and January 2012.

Average female length was 6.36 (0.55) cm (range, 5.40 – 7.30 cm). There was a difference in the length of females between the months sampled ( $F_{3; 62} = 5.35$ ;  $r^2 = 0.21$ ;  $P < 0.01$ ), with females of November ( $n= 6$ ; mean = 5.96 (0.86) cm) having length less than the February ( $n= 20$ ; mean = 6.45 (0.84) cm) and May ( $n= 16$ ; mean = 6.62 (0.97) cm) and December ( $n= 24$ ; mean = 6.22 (0.97) cm) is also lower than in May (Figure 1, Table 1).

During two of the field work periods were observed construction of aggregations of molt chambers. There were 18 chambers in one aggregation adhered to a fallen tree trunk (Figures 2A, B) and 25 chambers in another aggregation in the leaf litter. The average length of the chambers' circumference ( $n = 25$ ) was 13.30 (0.16) cm (range, 12.0 – 15.5 cm) and the average height was 3.12 (0.11) cm (range, 2.0 – 4.0 cm). Chambers were built side-by-side, some of which were strongly connected with the substrate (feces). Even if unconnected, many chambers were found in the same location. Chamber walls are somewhat firm, but within one that broke open was a molting individual, that was a last stage male, with a soft and flexible, light colored exoskeleton (Fig. 2C). Upon analysis of intestinal content, was observed that it had ingested its own shed exoskeleton (Fig. 2D). Another chamber had an individual about to undergo ecdysis (Fig. 2E). Many chambers were empty with no exoskeleton remains. Individuals of this species

survived for more than one year and remain inactive in molt chambers during the dry period.

## Discussion

The reproductive period of *T. klossae* apparently begins in December and continues to May, during which time rainfall is most abundant in Cuiabá (BDMEP; INMET, 2012). In November, when the rains begin, individuals may be found foraging on the ground and with no indication of reproduction. Synchrony in oocyte maturation is common in millipedes, which may help coordinate the timing of reproduction at the best time for juveniles survival (NEWPORT, 1841).

The smaller females of *T. klossae* collected in November were without developed ovary. This observation corresponds with the findings by Warburg and Gealekman (2000) in *Catamicrophyllum caifanum* Verhoeff, 1920. According to their observations body length is an important character to determine the reproductive period in many diplopods.

Growth in most millipedes is anamorphic and segments are added when molting (NEWPORT, 1841; ENGHOFF et al., 1993). Along with addition of segments during growth, legs, defense glands, ocelli (if present in adults), cuticular lining and epithelium of the intestines all are also added with molt (HOPKIN; READ, 1992; ENGHOFF et al., 1993).

Millipedes are quite vulnerable during molt process and hence they find refuge to carry out molt. Thus, the molt chambers provide a protective shelter during this phase in several species (FONTANETTI, 1989; HOPKIN; READ, 1992). Molt chambers built of feces are well known in this class of millipedes and the order Polydesmida is known for their elaborate molt chamber design (FONTANETTI, 1989; HOPKIN; READ, 1992).

The occurrence of aggregates or massive displacement in of diplopods are the best known aspects of millipede behavior. However, the reasons for aggregation remain uncertain. Predation avoidance and water retention have been proposed as explanatory hypotheses remain untested (HOPKIN; READ, 1992). This report of aggregated molt chambers in *T. klossae* is the first reported until now. It can be affirm that the attached chambers help to conserve energy by using the existing chamber wall, requiring less substrate (feces) and less time to perform this activity. The similar size of all molt chambers suggests that this particular molt occurs when all

individuals are at the same developmental stage, which may be associated with synchronous reproduction.

According to Saudray (1953), mineral salts (especially calcium) are lost during molt in millipedes and ingestion of the exuvium is a means by which salts are recovered. Since molt chambers always lack exuvia, this supports the idea that they are completely ingested, as in other species of millipede (HOPKIN; READ, 1992).

Thus, development of *T. klossae* is annual, with animals remaining inactive in molt chambers for six months of the year (June to November) until they reach the eight stages of development. Reproduction begins in December and ends in May.

### Acknowledgments

The authors thank to FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*) for the fellowship and CNPq, the National Institute for Science and Technology in Humid Areas (*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas*; INAU/MCT/CNPq/UFMT) and PRONEX/2009 (FAPEMAT/CNPq) for financial support of this study. James J. Roper translated the text from the original Portuguese.

### References

BDMEP - BANCO DE DADOS METEORÓLOGICOS PARA ENSINO E PESQUISA; INMET - INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>>. Acesso em: 28 set. 2012.

ENGHOFF, H.; DOHLE, W.; BLOWER, J. G. Anamorphosis in millipedes (Diplopoda) – the present state of knowledge with some developmental and phylogenetic considerations. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 109, p. 103-234, 1993.

FONTANETTI, C. S. Moulting behavior in chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, n. 4, p. 1053-1055, 1989.

HOFFMAN, R. L. A synopsis of the Telonychopodini, a tribe of Pantanalian chelodesmid millepedes (Polydesmida; Chelodesmidae). **Myriapodologica**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2000.



HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. de. Pratical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). **Amazoniana**, v. 14, n. 1/2, p. 1-35, 1996.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 1992. 232 p.

NEWPORT, G. The Bakerian lecture: on the organs of reproduction, and the development of the Myriapoda. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 31, p. 99 – 130, 1841.

PENA-BARBOSA, J. P. P. Revisão taxonômica e análise cladística do gênero *Odontopeltis* Pocock, 1894 (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae). Dissertação. 2011. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SAUDRAY, Y. La composition du tegument et ses modifications au moment de la mue chez les Myriapodes Diplopodes. **Compt. Rend. Acad. Sci. Paris**, v. 237, p. 1802-1804, 1953.

WARBURG M. R.; GEALEKMAN, O. Ovarian structure and oogenetic cycle in the millipede *Catamicrophyllum caifanum* (Diplopoda: Iulidae). **Journal of Zoology**, v. 250, p. 79-85, 2000.

**Table 1** – Results of Tukey test for comparison of body length of *T. klossae* females between the months sampled.

	December	February	May	November
December	1.00			
February	0.28	1.00		
May	< 0.05*	0.58	1.00	
November	0.50	0.05*	< 0.01*	1.00

\* Months in which females have statistically different body length.

## Figure legends

**Figure 1** – Comparison of female millipede length over the time duration of this study (means with 95% confidence intervals), suggesting the reproductive status.

Averages and confidence intervals of body length of *T. klossae* females in each month sampled.

**Figure 2** – Molt chambers (arrows) of *T. klossae* (A) adhered to the under surface of a treefall (overturned) and in contact with the soil and (B) only in direct contact with soil. (C) Recently molted male within an opened chamber. (D) Intestinal contents of an individual undergoing molt. (E) An individual prior to undergoing molt in typical spiral position.

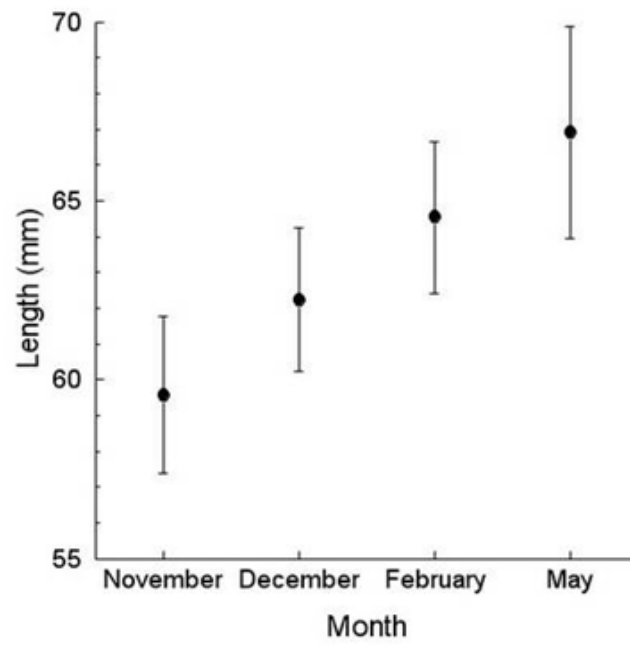


Figure 1



Figure 2

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho constitui um dos poucos registros sobre morfologia ovariana e ciclo ovogenético de espécies de Diplopoda do Brasil e da região Neotropical. Os resultados obtidos permitiram evidenciar que:

- O aparelho reprodutor feminino maduro dos Diplopoda apresenta uma variedade de conformações, assim, o estabelecimento de uma configuração comum à classe torna-se prematuro;
- Os mecanismos de desenvolvimento ovocítico nos diplópodos também são bastante variáveis e, por apresentarem um volume de informação muito menor que a morfologia ovariana, a comparação entre as espécies é dificultada;
- Os ovários não pareados encontrados nas fêmeas adultas em *P. salvator* e *M. hastatus*, família Pyrgodesmidae, constitui uma condição apomórfica para os diplópodos, enquanto que a configuração pareada observada de *T. klossae*, família Chelodesmidae, é uma condição plesiomórfica. Essas condições, provavelmente, refletem as características dos indivíduos dessas famílias como o tamanho corporal e suas histórias de vidas;
- *Poratia salvator* e *M. hastatus* reproduzem-se continuamente durante o ano todo, com incremento em sua reprodução ocorrendo nos períodos de enchente e cheia. Como este último período é bastante crítico por provocar uma maior mortalidade dos juvenis devido à alta pluviosidade, os períodos seguintes (vazante e seca) são afetados, caracterizando-se como os de menor número de fêmeas reprodutivamente viáveis. Estratégias de sobrevivência como construção de ninhos, câmaras de muda e busca por estratos inferiores do solo auxiliam os indivíduos da espécie a suportarem alterações de umidade, típicas do Pantanal matogrossense.
- O desenvolvimento completo de *T. klossae* é anual com a espécie permanecendo inativa em câmaras de muda durante seis meses do ano (junho a novembro), até atingir os oito estádios de desenvolvimento; sua reprodução se inicia em dezembro e se estende até maio. É uma espécie que apresenta um comportamento inédito para os diplópodos que é a construção de câmaras de muda agregadas, por indivíduos que, aparentemente, pertencem à mesma ninhada.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIS, J. Terrestrial invertebrates: Survival strategies, group spectrum, dominance and activity patterns, p. 299-371. In JUNK, W. E. (Ed.). **The Central Amazonian floodplain. Ecology of a pulsing system**. Berlin: Springer, 1997. 525p.

ADIS, J.; HARVEY, M. S. How many Arachnida and Myriapoda are there world-wide and in Amazonia? **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 35, p. 139-141, 2000.

ADIS, J.; GOLOVATCH, S. I.; HAMANN, S. Survival strategy of the terricolous millipede *Cutervodesmus adisi* Golovatch (Fuhrmannodesmidae, Polydesmida) in a blackwater inundation forest of Central Amazonia (Brazil) in response to the flood pulse. In GEOFFROY, J.-J.; MAURIES, J.-P.; NGUYEN DUY-JACQUEMIN, M. (Eds.). **Acta Myriapodologica**. Paris: Mémoires du Muséum National D'Histore Naturelle, 1996. 682p.

ADIS, J.; MARQUES, M. I.; WANTZEN, K. M. First observations on the survival strategies of terricolous arthropods in the northern Pantanal wetland of Brazil. **Andrias**, v. 15, p. 127-128, 2001.

ADIS, J.; GOLOVATCH, S. I.; LARS, W.; HANSEN, B. On the identities of *Muyudesmus obliteratus* Kraus, 1960 versus *Poratia digitata* (Porat, 1889), with first biological observations on parthenogenetic and bisexual populations (Diplopoda: Polydesmida: Pyrgodesmidae), p. 149-170. In: WYTWER, J.; GOLOVATCH, S. I. (Eds.). **Progress in studies on Myriapoda and Onychophora**. Warszawa, Fragmenta Faunística (Supplement), n. 43, XIV+396p, 2000.

ADIS, J.; FODDAI, D.; GOLOVATCH, S. I.; HOFFMAN, R. L.; MINELLI, A.; MORAIS, J. W. de; PEREIRA, L. A.; SCHELLER, U.; SCHILEYKO, A. A.; WÜRMLI, M. Myriapoda at "Reserva Duke", Central Amazonia/Brazil. **Amazoniana**, v. XVII, n. 1/2, p. 15-25, 2002.

ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4 (Suplemento), p. 957-966, 2008.

ALHO, C. J. R.; SILVA, J. S. V. Effects of severe floods and droughts on wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil) - A review. **Animals**, v.2, p. 591-610, 2012.

ANDERSON, E.; TELFER, W. H. A. A follicle cell contribution to the yolk spheres of moth oocytes. **Tissue and Cell**, v. 1, p. 633-644, 1970.

BANCO DE DADOS METEORÓLOGICOS PARA ENSINO E PESQUISA (BDMEP), INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>>. Acesso em: 28 set. 2012.

BANO, K.; KRISHNAMOORTHY, R. V. Reproductive strategy and life history of *Jonespeltis splendidus* (Verhoeff) (Diplopoda: Polydesmida) with environmental synchronization. **Journal of Soil Biology and Ecology**, v. 5, n. 1, p. 48-57, 1985.

BAST, R. E.; TELFER, W. H. Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the *Cecropia* moth oocyte. **Developmental Biology**, v. 52, p. 83-97, 1976.

BATTIROLA, L. D.; MARQUES, M. I.; ROSADO-NETO, G. H.; PINHEIRO, T. G.; PINHO, N. G. C. Vertical and time distribution of Diplopoda (Arthropoda, Myriapoda) in a monodominant forest in Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Zoologia**, v. 26, p. 479-487, 2009.

BERCOVITZ, K; WARBURG, M. R. Developmental patterns in two populations of the millipede *Archispirostreptus syriacus* (De Saussure) in Israel (Diplopoda). **Bijdr. Tot Dierk.**, v. 55, p. 37-46, 1985.

BERGHOLZ, N. G. R. **Ecological traits and genetic variation in Amazonian populations of the Neotropical millipede *Poratia obliterata* (Kraus, 1960) (Diplopoda: Pyrgodesmidae) (Brazil)**. Invertebrate Ecology & Conservation Monographs, Sofia: Pensoft Publishers, 2007. 197p.

BISWAS, S.; SARREN, M. L.; GILL, A. Ovarian structure and role of nucleolar emissions in vitellogenesis of *Thyropygus nigrolabiatus* (Newport). **Uttar Pradesh J. Zool.**, v. 7, n. 1, p. 70-75. 1987.

BLOWER, J. G. The millipedes of a Cheshire wood. **Journal of Zoology, London**, v. 160, p. 455-496, 1970.



BLOWER, J. G. Millipedes. Linnean Society Synopses of the British Fauna (New Series), n. 35, 1985.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C. H. S.; CHAGAS, R. J. Migration and population outbreaks of the millipedes in the coffee plantations region of the Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v. 2, n. 2, p. 220-223, 2002.

BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N. Toxicidade do carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.

BOOCK, O. L.; LORDELLO, L. G. E. Diplópoda depredador de tubérculos de batatinhas. **Bragantia**, v. 12, n. 10-12, p. 343-347, 1952.

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

CAVE, M.D. Morphological manifestations of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. In AKAI, H. & KING, R. (Eds). **Insect Ultrastructure**. Plenum Publishing Co, New York, pp. 86-117, 1982.

CRANE, D. F.; COWDEN, R. R. A cytochemical study of oocyte growth in four species of millipedes. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 90, p. 414-431, 1968.

CRAWFORD, C. S.; MATLACK, M. C. Water relations of desert millipede larvae, larva-containing pellets, and surrounding soil. **Pedobiologia**, v. 19, p. 48-55, 1979.

CRAWFORD, C. S.; BERCOVITZ, K.; WARBURG, M. R. Regional environments, life-history patterns and habitat use of Spirostreptid millipedes in arid regions. **Zoological Journal of the Linnean Society of London**, v. 89, p. 63-88, 1987.

ENGHOFF, H. Parthenogenesis and bisexuality in the millipede *Nemasoma varicorne* C. L. Koch, 1847 (Diplopoda: Blaniulidae). Morphological, ecological and biogeographical aspects. **Videnskabelige Meddelelser fra Dansk natuhistoriske Forening i Kjøbenhavn**, v. 139, p. 21-59, 1976.

ENGHOFF, H. Geographical parthenogenesis in millipedes (Diplopoda). **Biogeographica**, v. 70, p. 25-31, 1994.

ENGHOFF, H.; DOHLE, W.; BLOWER, J. G. Anamorphosis in millipedes (Diplopoda) – the present state of knowledge with some developmental and phylogenetic considerations. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 109, p. 103-234, 1993.

FABRE, L. Recherches sur l'Anatomie des organes reproducteur et sur le developpement des Myriapodes. **Annales des Sciencees Naturelles (Zoologie)**, v. 3, p. 256 – 320, 1855.

FONTANETTI, C. S. Moulting behavior in chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, n. 4, p. 1053-1055, 1989.

FONTANETTI, C. S. Morphology of testicles of some Brazilian species of Diplopoda and their phylogenetic relations. **Revista Brasileira Zoologia**, v.7, p. 541-544, 1991.

FONTANETTI, C. S.; STAURENGO DA CUNHA, M. A. Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 53, n. 1, p. 7-12, 1993.

FONTANETTI, C. S.; ZIRONDI, M. C. Initial development of the diplopod *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) under populational expansion in coffee plantations (Spirostreptida, Spirostreptidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 55, p. 55-62, 2000.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 37, n. 5, p. 301 – 306, 2004.

FONTANETTI, C. S.; SOUZA, T. da S.; CALLIGARIS, I. B.; BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. **Animal Biology**, v. 60, p. 467–478, 2010.

FONTANETTI, C.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. da S.; IAMONTE, M. Ultrastructure of oocytes of the *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptida, Spirostreptidae): a potential urban centers plague. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1486–1491, 2012.

FONTANETTI, C. S.; ZIRONDI, M. C. Desenvolvimento inicial do diplópodo *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) sob expansão populacional em plantações de café (Spirostreptida, Spirostreptidae). **Arquivos do Instituto Biológico São Paulo**, v. 67, n. 1, p. 55-62, 2000.

FREITAS, V. C. de; ZIRONDI, M. C.; FONTANETTI, C. S. Ovarian morphology in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda, Arthropoda). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 20, n. 3, p. 153-156, 2003.

FREITAS, V. C.; FONTANETTI, C. S. Testicular morphology and histochemical of *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 (Diplopoda, Pseudonannolenidae). **Naturalia**, v. 28-30, p. 24-27, 2005.

GEALEKMAN, O.; TICHOMIROVA, E.; WARBURG, M. Phenology and reproduction of the iulid millipedes *Catamicrophyllum* spp. inhabiting the Mediterranean region in northern Israel. **Israel Journal of Zoology**, v. 42, p. 66, 1996.

GOLOVATCH, S. I. Review of the Neotropical fauna of the millipede family Fuhrmannodesmidae, with the description of four new species from near Manaus, Central Amazonia, Brazil (Diplopoda, Polydeamida). **Amazoniana**, v. 12, n. 2/4, p. 207–226, 1992.

GOLOVATCH, S. I. Further new Fuhrmannodesmidae from the environs of Manaus, Central Amazonia, Brazil, with a revision of *Cryptogonodesmus* Silvestri, 1898 (Diplopoda, Polydesmida). **Amazoniana**, v. 13, n. 1/2, p. 131–161, 1994.

GOLOVATCH, S. I. Two new and one little-known species of the millipede family Pyrgodesmidae from near Manaus, Central Amazonia, Brazil (Diplopoda: Polydesmida). **Amazoniana**, v. 14, n. 1/2, 109-120, 1996.

GOLOVATCH, S. I. On six new and some older Pyrgodesmidae from the environs of Manaus, Central Amazonia, Brazil (Diplopoda, Polydesmida). **Amazoniana**, v. 15, p. 221-238, 1999.

GOLOVATCH, S. I. Millipedes (Diplopoda) in extreme environments, p. 87–112. In: GOLOVATCH, S. I.; MAKAROVA, O. L.; BABENKO, A. B.; PENEV, L. (Eds). **Species and Communities in Extreme Environments**. Festschrift towards the 75th Anniversary and a Laudatio in Honour of Academician Yuri Ivanovich Chernov. Moscou, Pensoft & KMK Scientific Press, 2009.

GOLOVATCH, S. I.; SIERWALD, P. Review of the millipede genus *Poratia* Cook & Cook, 1894 (Diplopoda: Polydesmida: Pyrgodesmidae). **Arthropoda Selecta**, v. 9, n. 3, p. 181-192, 2000.

GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J. *Myrmecodesmus hastatus* (Schubart, 1945), a widespread Neotropical millipede (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). **Fragmenta Faunistica**, v. 47, n. 1, p. 35–38, 2004.

GOLOVATCH, S. I.; KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: a review. **Soil Organisms**, v. 81, n. 3, p. 565-597, 2009.

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

GOLOVATCH, S. I.; HOFFMAN, R. L.; ADIS, J.; MARQUES, M. I.; RAIZER, J.; SILVA, F. H. O.; RIBEIRO, R. A. K.; SILVA, J. L. ; PINHEIRO, T. G. Millipedes (Diplopoda) of the Brazilian Pantanal. **Amazoniana**, v. XVIII, n. 3/4, p. 273-288, 2005.

HEATH, J. BOCOCK, K. L.; MOUNTFORD, M. D. The life history of the millipede *Glomeris marginata* (Villers) in North-West England. **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 32, p. 433-462, 1974.

HECKMAN, C. W. **The Pantanal of Poconé. Biota and ecology in the northern section of the world's largest pristine wetland.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 622p.

HERBAUT, C.; JOLY, R. Activité ovarienne et cycle ovogénétique chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). **Arch. Zool. Exp. Gén.**, v. 113, 1972.

HOFFMAN, R. L. A synopsis of the Telonychopodini, a tribe of Pantanalian chelodesmid millepedes (Polydesmida; Chelodesmidae). **Myriapodologica**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2000.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. de. Pratical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). **Amazoniana**, v. 14, n. 1/2, p. 1-35, 1996.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. de. Diplopoda. In: ADIS, J. (Ed.). **Amazonian Arachnida and Myriapoda.** Sofia: Pensoft Plubishers, 2002. 590p.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes.** New York: Oxford University Press, 1992. 232 p.

IATROU, G. D.; STAMOU, G. P. Studies on the life cycle of *Glomeris balcânica* (Diplopoda, Glomeridae) under laboratory conditions. **Pedobiologia**, v. 34, p. 173-181, 1990.

IATROU, G. D.; STAMOU, G. P. The life cycle and spatial distribution of *Glomeris balcania* (Diplopoda, Glomeridae) in an evergreen-sclerophyllous formation in northern Greece. **Pedobiologia**, v. 35, p.1-10, 1991.

JENSEN, L. H. et al. Genetic diversity and the phylogeography of parthenogenesis: comparing bisexual and thelytokous populations of *Nemasoma varicorne* (Diplopoda: Nemasomatidae) in Denmark. **Hereditas**, v. 136, p. 184-194, 2002.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in riverfloodplain- systems. **Canadian Special Publications for Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 106, p. 110–127, 1989.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. G. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123 p.

KANAKA, R; CHOWDAIAH, R. N. Studies on the male reproductive pattern in some Indian Diplopoda (Myriapoda). **Symp. Zoot. Soc. London**, v. 32, p. 261-272, 1974.

KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linneus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v. 4, p. 57-66, 2005.

KUBRAKIEWICZ, J. The ovary structure in two species of millipedes, *Iulus scandinavicus* and *Orthomorpha gracilis* (Myriapoda, Diplopoda). **Zool. Polon.** v. 34, p. 251-260. 1987.

KUBRAKIEWICZ, J. Deposition of calcium salts in oocytes and ovarian somatic tissue of millipedes. **Tissue and Cell**, v. 21, p. 444 -446, 1989.

KUBRAKIEWICZ, J. Ultrastructural investigation of ovary structure of *Ophiulus pilosus* (Myriapoda, Diplopoda). **Zoomorphology**, v.110, p. 133-138, 1991a.

KUBRAKIEWICZ, J. Ovary structure and oogenesis of *Polyxenus lagurus* (L.) (Diplopoda: Pseulaphognatha). An ultrastructural study. **Zoologische Jahrbücher (Anatomie)**. v. 121, p. 81-93, 1991b.

LEWIS, J. G. E. The life history and ecology of the millipede *Tymbodesmus falcatus* (Polydesmida: Gomphodesmidae) in northern Nigeria with notes on *Sphenodesmus sherobongensis*. **Journal of Zoology**, v. 164, p. 551-563, 1971a.

LEWIS, J. G. E. The life history and ecology of the three paradoxosomatid millipedes (Diplopoda: Polydesmida) in northern Nigeria. **Journal of Zoology**, v. 165, p. 431-452, 1971b.

LISON, L. **Histochimie et cytochimie animales**. Ganthiervillars: Éditeur – Imprimeur – Libraire, 1985. 842p.

MAKIOKA, T. Ovarian structure and oogenesis in chelicerates and other arthropods. **Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan**, v. 23, p. 1-11, 1988.

MARX, M. T.; GUHMANN, P.; DECKER, P. Adaptations and predispositions of different middle European arthropod taxa (Collembola, Araneae, Chilopoda, Diplopoda) to flooding and drought conditions. **Animals**, v. 2, p. 564-590, 2012.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Edgar Blucher; Campinas: FUNCAMP, 1980. 71p.

MILEY, H. H. Internal anatomy of *Euryurus erytropygus* (Brandt, Diplopoda). **Ohio Journal of Science**, v. 40, p. 229 -254, 1930.

MINELLI, A.; GOLOVATCH, S. I.. Myriapods. **Encyclopedia of Biodiversity**, v. 4, p. 291-303, 2001.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília, DF: MMA. Belo Horizonte: Fundação Biodivertistas, 2008. 511p.

NADARAJALINGAM, K.; SUBRAMONIAN, T. Oogenesis in a millipede *Spirostreptus asthenes* (Myriapoda, Diplopoda). **Zoologischer Anzeiger**, v. 212, p. 229 – 239, 1984.

NAIR, V. S. K. Oocyte developmental and vitellogenesis in *Jonespeltis splendidus* (Myriapoda: Diplopoda). **Journal of Animal Morphology and Physiology**, v. 28, p. 186-194, 1981.

NEWPORT, G. The Bakerian lecture: on the organs of reproduction, and the development of the Myriapoda. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 31, p. 99 – 130, 1841.

PAZ, A. R da; COLLISCHONN, W.; TUCCI, C. E. M. Large-scale modelling of channel flow and floodplain inundation dynamics and its application to the Pantanal (Brazil). **Hydrological Process**, v. 25, p. 1498-1516, 2011.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied** . 4. ed., London: J&A. Churchill, 1985. 998 p.

PEITSALMI, M. Population structure and seasonal changes in activity of *Proteroiulus fuscus* (Am Stein) (Diplopoda, Blaniulidae). **Acta Zoologica Fennica**, v. 161, p. 1-66, 1981.

PENA-BARBOSA, J. P. P. Revisão taxonômica e análise cladística do gênero *Odontopeltis* Pocock, 1894 (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae). Dissertação. 2011. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PETIT, J. Sur la et l'acumalation de substances minerales dans lês ovocytes de *Polydesmus complanatus* (Myr. Dipl.). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, p. 2107-2110, 1970.

PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M. I.; BATTIROLA, L. D. Life cycle of *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). **Zoologia**, v. 26, n. 4, p. 658–662, 2009.

PINHEIRO, T. G.; BATTIROLA, L. D.; MARQUES, M. I. Fertility tables of two populations of the parthenogenetic species *Poratia salvator* (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 2, p. 501-510, 2011.

POFF, N. L.; ALLAN, J. D.; BAIN, M. B.; KARR, J. R.; PRESTEGAARD, K. L.; RICHTER, B. D.; SPARKS, R. E.; STROMBERG, J. C. The natural flow regime: a paradigm for river conservation and restoration. **Bioscience**, v. 47, n. 11, p. 769–784, 1997.

RAMAMURTY, P. S. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly *Panorpa communis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 14, p. 1325-1330, 1968.

SAREEN, M. L. Cytochemical studies on the female germ cells of a common millipede, *Phyllogonostreptus nigrolaciatus* (Newport). **Res. Bull. N. S. Panjab Univ.**, v. 18, p. 363-368, 1967.



SAREEN, M. L.; ADIYODI, K. G. Arthropoda-Myriapoda. 1. Oogenesis, oviposition and oosorption. In: ADIYODI, K. G; ADIYODI, R. G. (Ed.). **Reproductive biology of invertebrates**. Chichester: Wiley & Sons, 1983. p. 497-520.

SAUDRAY, Y. La composition du tegument et ses modifications au moment de la mue chez les Myriapodes Diplopodes. **Compt. Rend. Acad. Sci. Paris**, v. 237, p. 1802-1804, 1953.

SCHUBART, O. Novos diplópodos do Brasil. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia**, v. 9, p.145-157, 1950.

SEIFERT, B. Anatomie und Biologie des Diplopoden *Strongylosoma pallipes*. **Oliv. Zeits. Fur Morph. Und Okol. Tiere**, v. 25, p. 362 – 507, 1932.

SHARMA, G.; CHHOTANI, O. B. The millipede egg. **Research bulletin of the Panjab University**, v. 103, p. 2241-2250, 1957.

SHELLEY, R. M. A revised, annotated, family-level classification of Diplopoda. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n, 3, p. 187-207, 2003.

STEARNS, S. C. Life-history: a review of the ideas. **The Quarterly Review of Biology**, v. 51, n. 1, p. 3-47, 1976.

STOEV, P.; ENGHOFF, H. A revision of the millipede tribe Apfelbeckiini Verhoeff, 1900 (Diplopoda: Callipodida: Schizopetalidae). **Steenstrupia**, v. 36, p. 47–66, 2008.

VOHLAND, K.; ADIS, J. Life history of *Pycnotropis tida* (Diplopoda: Polydesmida: Aphelidesmidae) from seasonally inundated forest in Amazonia (Brazil and Peru). **Pedobiologia**, v. 43, p. 231-244, 1999.

VOIGTLÄNDER, K. Observations on nest construction by *Polydesmus denticulatus* C. L. Koch, 1847. **Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseum Görlitz**, v. 72, p. 235-237, 2000.

WARBURG M. R.; GEALEKMAN, O. Ovarian structure and oogenetic cycle in the millipede *Catamicrophyllum caifanum* (Diplopoda: Iulidae). **Journal of Zoology**, v. 250, p. 79-85, 2000.

WARBURG, M. R.; ROSENBERG, M.; JOHNS, P. M. Ovarian structure in a millipede, *Eumastigonus* sp. (Diplopoda, Cambalidae). **New-Zealand Journal of Zoology**, v. 25, p. 301-306, 1998.

WERNER, F. P. Miriápodos (Spirostreptidae) sobre tubérculos de batatinha (*Solanum tuberosum* L.). **Bol. Min. Agric.**, v. 30, n. 12, p.15-40, 1941.

WITZEL, K.-P.; ZAKHAROV, I. A.; GORYACHEVA, I. I.; ADIS, J.; GOLOVATCH, S.I. Two parthenogenetic milipede species/lines of the genus *Poratia* Cook & Cook, 1894 (Diplopoda, Polydesmida, Pyrgodesmidae) found free from *Wolbachia* bacteria. **African Invertebrates**, v. 44, n. 1, p. 331-338, 2003.

YAHATA, K.; MAKIOKA, T. Phylogenetic implications of structure of adult ovary and oogenesis in the penicillate diplopod, *Eudigraphis nigricans*(Miyosi) (Diplopoda: Myriapoda). **Journal of Morphology**, v. 222, p. 223-230, 1994.

YAHATA, K.; MAKIOKA, T. Postembryonic development of the ovary in the penicillate diplopod *Eudigraphis negricans* (Myiosi, 1947). **Journal of Morphology**, v. 224, n. 2, p. 213-220, 1995.

YAHATA, K.; MAKIOKA, T. Phylogenetic significance of the structure of adult ovary and oogenesis in a primitive chilognathan diplopod, *Hyleoglomeris japonica* Verhoeff (Glomerida, Diplopoda). **Journal of Morphology**, v. 231, p. 277-285, 1997.

ZIRONDI M. C ; PINHEIRO, T. G. ; FONTANETTI, C. S. Ovarian morphology and oogenesis of *Leptodesmus dentellus* (Diplopoda, Polydesmida, Chelodesmidae) **Animal Biology**, p. 1-16, 2013.