

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO Departamento de Biologia



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

# ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA, MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL EM ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: UM ENFOQUE EVOLUTIVO

**VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS** 

Rio Claro, São Paulo, Brasil Abril de 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO Departamento de Biologia



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

# ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA, MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL EM ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: UM ENFOQUE EVOLUTIVO

# **VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Rio Claro, São Paulo, Brasil Abril de 2013

 595.44 Mattos, Viviane Fagundes de M444a Análise citogenética clássica, molecular e ultraestrutural em escorpiões da família Buthidae: um enfoque evolutivo / Viviane Fagundes de Mattos. - Rio Claro : [s.n.], 2013 124 f. : il., figs., tabs.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientador: Marielle Cristina Schneider

Aracnídeo. 2. Escorpião. 3. Complexo sinaptonêmico.
Cromossomo. 5. Meiose. 6. Número diploide. 7. rDNA
I. Título.

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



#### UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE RIO CLARO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE CITOGENÈTICA CLÁSSICA, MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL EM ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: UM ENFOQUE EVOLUTIVO

AUTORA: VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIELLE CRISTINA SCHNEIDER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIELLE CRISTINA SCHNEIDER Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. RODRIGO MARQUES LIMA DOS SANTOS Instituto de Biociências / USP

atronadi

Prof. Dr. MATEUS MONDIN ESALQ / USP

Data da realização: 05 de abril de 2013.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Anizia R. O. Fagundes e Lourenço F. Mattos, e ao meu irmão Guilherme F. Mattos, por todo amor e carinho dados durante toda a minha vida.

À Doralice M. Cella (in memorian), pela confiança, oportunidade, apoio e incentivo dados durante esses dois anos de caminhada.

#### AGRADECIMENTOS

É preciso saber quando uma etapa chega ao final e muito mais do que isso, é preciso agradecer as pessoas que fizeram parte dessa jornada – encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos – assim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma ou de outra contribuíram para a minha formação acadêmica, bem como para a realização deste trabalho. Em especial:

À Deus, pelo dom da vida, força e refúgio, me fortalecendo em todas as ocasiões, principalmente nos momentos mais difíceis dessa dura jornada.

À Profa. Dra. Marielle C. Schneider, minha orientadora, pela oportunidade proporcionada para minha formação profissional e pessoal, amizade, confiança, paciência, atenção e cuidado na orientação e leitura dos trabalhos, enfim, muito obrigada por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Doralice M. Cella (*in memorian*) pelo caráter inigualável, exemplo de amor a pesquisa e a tudo o que fez, pela confiança, oportunidade, amizade, risos, lanchinhos "venenosos", caleidoscópios e orquídeas.

À MSc. Denise M. Candido e ao Prof. MSc. Leonardo S. Carvalho por disponibilizar e identificar alguns espécimes de Buthidae estudados neste trabalho.

À Profa. Dra. Sanae Kasahara, pela amizade, ensinamentos e leitura crítica do Capítulo I apresentado neste trabalho. Ao Prof. Dr. Diogo C. Cabral de Mello e ao geneticista Octavio M. P. Gimenez pelo auxílio na realização da técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente.

A Elsie C. B. Cruz pelo auxílio com a língua inglesa bem como pelos bons momentos desperdiçados a alegria.

Ao corpo docente do Departamento de Biologia, UNESP, Rio Claro, com o qual tive a oportunidade de conviver, os quais não transmitiram apenas conhecimento, mas exemplos de postura profissional.

Aos meus colegas Amalia T. Lopes e Emygdio de Paula-Neto por toda amizade, discussões profissionais e companheirismo nas atividades laboratoriais e de campo.

Aos meus amigos, Allison K. Anjos, Crislaine X. Silva, Diogo C. Cabral de Mello, Octavio M. P. Gimenez, Tatiane C. Mariguela, Thiago Gazoni e Weilan G. P. Melo, pelos churrascos, risos e discussões profissionais.

Aos meus amigos biólogos, Carla F. B. Floriano, Daiane D. Boneto, Eliz Dias, Genandrea K. Cruz, Leandro F. Celestino, Marcia G. Kraéski pelo apoio e incentivo, principalmente pela amizade que supera a distância geográfica.

À família Heleodoro, Cristina R. S. Heleodoro, João P. R. Heleodoro, Agnaldo J. H. Arruda e Agnaldo J. H. A. Junior, por todo o incentivo, apoio, carinho, risos e almoços, mas acima de tudo, por me acolher no seio de sua família como parte desta. Muito obrigada! À minha família, Anizia R. O. Fagundes, Guilherme F. Mattos e Lourenço F. Mattos, agradeço todo amor, carinho, compreensão, respeito, amizade, incentivo, exemplo de família, união e honestidade. Amo vocês!

À FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro, referente a bolsa de pós-graduação.

No decorrer de toda a minha formação acadêmica recebi ajuda de diversas pessoas as quais não me permitiram desistir dessa dura jornada.

Obrigada!

Hoje me sinto mais forte, Mais feliz, quem sabe Só levo a certeza De que muito pouco eu sei, Ou nada sei [...] Penso que cumprir a vida Seja simplesmente Compreender a marcha E ir tocando em frente Como um velho boiadeiro Levando a boiada Eu vou tocando os dias Pela longa estrada, eu vou Estrada eu sou [...] Cada um de nós compõe a sua história Cada ser em si Carrega o dom de ser capaz E ser feliz [...] É preciso amor Para pulsar É preciso paz pra poder sorrir É preciso a chuva para florir (Trechos da música Tocando em Frente de Almir Sater)

#### RESUMO

A família Buthidae possui cerca de 900 espécies descritas taxonomicamente; porém, menos de 5% destas espécies foram analisadas sob o ponto de vista citogenético. O número diploide nos butídeos varia entre 2n=5 a 2n=56, e a presença de cromossomos holocêntricos com comportamento sináptico e aquiasmático durante a meiose I é uma característica comum a todas as espécies previamente estudadas. Neste trabalho, os cromossomos mitóticos e meióticos de 11 espécies de escorpiões Buthidae (Ananteris balzanii, Rhopalurus agamemnon, Rhopalurus rochai, Tityus bahiensis, Tityus confluens, Tityus costatus, Tityus fasciolatus, Tityus maranhensis, Tityus martinpaechi, Tityus paraguayensis e Tityus stigmurus) foram estudados através de técnicas de citogenética clássica, molecular e ultraestrutural, com o objetivo de estabelecer os mecanismos responsáveis pela diversidade inter e intraespecífica de número cromossômico e/ou origem das complexas associações multivalentes observadas durante a meiose I, bem como, a evolução dos cromossomos holocêntricos. Nas 11 espécies examinadas, o número diploide variou de 2n=6 a 2n=28 e, em representantes dos três gêneros, associações cromossômicas multivalentes foram observadas em células paquitênicas e pós-paquitênicas. Além disso, uma variabilidade intraespecífica quanto à presença ou ausência de cadeias cromossômicas e ao número de cromossomos envolvidos nas complexas associações multivalentes foi observada em A. balzanii, R. agamemnon, R. rochai, T. bahiensis, T. maranhensis e T. paraguayensis. Células impregnadas pelo íon prata e submetidas à técnica de FISH revelaram certa constância quanto ao número e localização das RONs ativas e sítios de rDNA 45S, apesar da grande variação cromossômica verificada entre as espécies, visto que, RONs localizadas na região terminal ou subterminal de dois cromossomos foi o padrão comum para os butídeos estudados. Contudo, a análise de células meióticas revelou que indivíduos portadores das mesmas configurações cromossômicas durante a prófase I podem diferir quanto a localização dos sítios de rDNA 45S, ou seja, o rDNA pode ocorrer em elementos envolvidos nas associações multivalentes ou em elementos totalmente sinapsados, semelhantes a bivalentes. Núcleos submetidos ao bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos mostraram que as espécies que apresentaram blocos de heterocromatina exibiram menores taxas conspícuos as de rearranjos cromossômicos. O estudo de microestendidos celulares em microscopia eletrônica de transmissão de R. agamemnon, R. rochai, T. bahiensis e T. fasciolatus, revelou complexo sinaptonêmico com uma estrutura tripartida típica e bem preservada até estágios tardios da prófase I, ausência de placa cinetocórica e nódulos de recombinação. Além disso, segmentos descontínuos, filamentos únicos, gaps e interlockings foram visualizados e são indicativos da ocorrência de rearranjos cromossômicos heterozigotos e/ou heterosinapse. Levando-se em conta todos os resultados obtidos com a investigação de células mitóticas e meióticas, foi possível determinar que a variabilidade intraespecífica ocorreu como consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fissão/fusão nas espécies de Ananteris e Tityus, e translocação recíproca nas espécies de Rhopalurus. Verificamos também, que indivíduos apresentando o mesmo número diploide podem diferir quanto à organização estrutural dos cromossomos, dando origem a diferentes associações multivalentes intraespecíficas observadas nas células meióticas (elementos como bivalentes ou cadeias cromossômicas).

*Palavras-Chave*: Complexo sinaptonêmico. Cromossomo. Meiose. Número diploide. rDNA 45S.

#### ABSTRACT

The family Buthidae has about 900 species taxonomically described; however, less than 5% of these species were analyzed from the cytogenetic point of view. The diploid number in buthid ranges from 2n=5 to 2n=56, and the presence of holocentric chromosomes with synaptic and achiasmatic behavior during the meiosis I is a common feature for all previously studied species. In this work, the mitotic and meiotic chromosomes of 11 species of Buthidae scorpions (Ananteris balzanii, Rhopalurus agamemnon, Rhopalurus rochai, Tityus bahiensis, Tityus confluens, Tityus costatus, Tityus fasciolatus, Tityus maranhensis, Tityus martinpaechi, Tityus paraguayensis and Tityus stigmurus) were studied through classical, molecular and ultrastructural cytogenetic techniques, aiming to establish the responsible mechanisms for inter and intraspecific diversity of chromosomal number and/or origin of the multivalent complex associations observed during the meiosis I, as well as, the holocentric chromosome evolution. In the 11 species examined, the diploid number ranged from 2n=6 to 2n=28; multivalent chromosomal associations were observed in pachytene and postpachytene cells of species of the three genera. Moreover, an intraspecific variability regarding to the presence or absence of chromosome chains and the number of chromosomes involved in multivalent complex associations was observed in A. balzanii, R. agamemnon, R. rochai, T. bahiensis, T. maranhensis and T. paraguayensis. Silver-impregnated cells and nuclei submitted to the FISH technique revealed constancy in relation to the number and localization of the active NORs and rDNA 45S sites, respectively, despite of the high chromosomal variation verified among species, i.e., NORs located on terminal and subterminal region of two chromosomes were the common pattern for buthids studied here. Nevertheless, the analysis of meitotic cells showed that individuals carrier of same chromosomal configurations during the prophase I can differ in the localization of rDNA 45S sites - the rDNA sites occur in elements involved in multivalent associations or in elements totally synapsed, similar to bivalents. Nuclei submitted to the C-banding and base-specific fluorochromes staining showed that species which presented conspicuous blocks of heterochromatin exhibited the lower levels of chromosome rearrangements. The study of cell microspreading under transmission electron microscopy of R. agamemnon, R. rochai, T. bahiensis and T. fasciolatus, revealed synaptonemal complex with a typical tripartite organisation and well-preserved structure until later stages of prophase I, absence of kinetochore plate and recombination nodules. Additionally, discontinuous segments, single filaments, gaps and interlocking, which are indicative of the occurrence of heterozygous chromosomal rearrangements and/or heterosynapsis were visualised. Taking into account all results obtained through the investigation of mitotic and meiotic cells, it was possible to determine that the intraspecific variability occurred as consequence of chromosome rearrangements of fission/fusion type in Ananteris and Tityus species, and reciprocal translocation in Rhopalurus species. We also established that individuals with the same diploid number can differ in the structural organization of chromosomes, giving rise to different intraspecific multivalent associations observed in meiotic cells (elements like-bivalents or chromosome chains).

Keywords: Chromosome. Diploid number. Meiosis. rDNA 45S. Synaptonemal Complex.

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14								
2.	OBJETIVOS									
3.	MATERIAL E MÉTODOS									
3.1	MATERIAL									
3.2	MÉTODOS									
3.2.1	Obtenção das preparações cromossômicas 2									
3.2.2	Coloração convencional (Giemsa) 2									
3.2.3	Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo íon 2!									
	prata (Ag-RON)	20								
3.2.4	Técnica de obtenção das bandas C 2									
3.2.5	Colorações associadas 2									
3.2.6	Técnica de marcação com fluorocromos base-específicos	27								
	(CMA <sub>3</sub> /DAPI)	21								
3.2.7	Hibridização in situ fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 45S pDm	27								
	238	21								
3.2.8	Análises cromossômicas em microscopia de luz	29								
3.2.9	Obtenção e análise do complexo sinaptonêmico	30								
4.	RESULTADOS	31								

## ARTIGO I

"High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpio	ns"
Resumo	34
Abstract	36
Introduction	38
Materials and methods	40
Results	43
Discussion	56
Acknowledgements	62
References	62

#### ARTIGO II

"Localização dos genes de rDNA 45S em cromossomos mitóticos e meióticos de escorpiões da família Buthidae"

Resumo	73
Introdução	75
Material e métodos	77
Resultados	78
Discussão	82
Agradecimentos	85
Referências	85

## ARTIGO III

"Organização e comportamento do complexo sinaptonêmico durante a meiose aquiasmática de escorpiões Buthidae"

Resumo	93
Introdução	95
Material e métodos	97
Resultados	98
Discussão	103
Agradecimentos	107
Referências	107

5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

## 1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões frequentemente recebem a denominação de "fósseis vivos", uma vez que correspondem aos artrópodes mais antigos que se tem conhecimento, pois foram encontrados em registros do período Siluriano, datados de cerca de 400 milhões de anos atrás (Candido 1999; Prendini 2006). As espécies atuais de escorpiões são muito semelhantes anatomicamente àquelas encontradas na era Paleozoica, exceto pela diferença de tamanho, considerando que algumas espécies extintas atingiam até um metro de comprimento. Devido à grande semelhança morfológica com os extintos euripterídeos marinhos (escorpiões do mar), os escorpiões eram considerados como grupo-irmão dos demais aracnídeos. Porém, dados mais recentes mostram que os ordem Scorpiones mantiveram as representantes da apenas características consideradas morfologicamente basais e devem ser incluídos dentro da classe Arachnida (Prendini 2006). Os escorpiões são encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida, mas são mais abundantes e diversificados em regiões tropicais e subtropicais; habitam a maioria dos ecossistemas terrestres como, desertos, savanas e florestas, e algumas espécies também se tornaram bem adaptadas aos ambientes humanos (Cruz 1994; Prendini 2006).

Atualmente, estima-se que dentro da ordem Scorpiones existam cerca de 1.900 espécies descritas, as quais estão agrupadas em 18 famílias: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae. Chaerilidae. Diplocentridae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Heteroscorpionidae, Liochelidae. Microcharmidae, Pseudochactidae, luridae. Scorpionidae, Scorpiopidae, Superstitioniidae, Troglotayosicidae, Urodacidae е Vaejovidae (Prendini e Wheeler 2005; Rein 2012). Na fauna brasileira, há registros de aproximadamente 130 espécies de escorpiões, pertencentes às famílias Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Liochelidae (Porto et al. 2010).

Do ponto de vista citogenético, os escorpiões têm sido apenas esporadicamente investigados e não existe em todo o mundo um grupo de pesquisa dedicado de modo específico a análise deste grupo. No entanto, as informações cromossômicas registradas para as 70 espécies que foram previamente estudadas, mostram características cromossômicas peculiares, tais como: espécies com cromossomos holocêntricos ou monocêntricos, sendo que tal diversidade dentro de um mesmo grupo tem sido raramente registrada para outros táxons; meiose sináptica e aquiasmática, constituindo um tipo particular de meiose que suscita questionamentos sobre os mecanismos responsáveis pela variabilidade genética nos escorpiões, uma vez que não ocorre recombinação por *crossing-over*; rearranjos dos tipos translocações recíprocas ou fissões/fusões cromossômicas, os quais são fixados nas populações de forma heterozigota, diferindo acentuadamente da forma homozigota que é mais estável para outros grupos. Adicionalmente, algumas espécies de escorpiões, pertencentes principalmente à família Buthidae, apresentam reprodução por partenogênese telítoca, na qual fêmeas não fecundadas originam outras fêmeas (Schneider e Cella 2010).

Dentre os Scorpiones, a família Buthidae é a mais numerosa, com aproximadamente 90 gêneros e 900 espécies descritas taxonomicamente. A fauna brasileira é representada por 82 espécies distribuídas em oito gêneros: *Ananteris*, *Isometrus, Microtityus, Physoctonus, Rhopalurus, Tityus, Throglorhopalurus e Zabius*, os quais ocorrem em todas as regiões do Brasil, porém apresentam maior riqueza nas regiões Norte e Nordeste (Porto et al. 2010). Embora todos os escorpiões sejam considerados animais peçonhentos, Buthidae é o único grupo que apresenta uma grande importância médica devido ao fato do veneno de muitas espécies apresentarem toxicidade para os mamíferos (Soleglad e Fet 2003). No Brasil, os principais relatos de acidentes envolvendo escorpiões estão relacionados às espécies do gênero *Tityus* (Candido 1999; Porto e Brazil 2010).

15

A família Buthidae ocupa uma posição filogeneticamente basal dentro da ordem Scorpiones, sendo considerada grupo-irmão de todas as outras 17 famílias existentes (Prendini e Wheeler 2005). Embora a monofilia dos butídeos esteja bem definida, a relação entre os gêneros e espécies é ainda pouco conhecida. A análise cladística mais recente, baseada em dados moleculares, subdividiu os butídeos em dois grupos monofiléticos, "Velho Mundo" e "Novo Mundo" (Fet et al. 2003).

Os estudos citogenéticos foram realizados em menos que 5% das espécies de Buthidae (Tabela 1). Entre os 15 gêneros já investigados, quatro pertencem ao clado "Velho Mundo" (*Androctonus, Buthus, Hottentotta e Mesobuthus*) e três ao clado "Novo Mundo" (*Centruroides, Lycha*s e *Rhopalurus*). Os outros oito gêneros não foram incluídos nas análises filogenéticas. As informações cromossômicas parecem confirmar a monofilia de Buthidae, levando-se em conta que esta é a única família dentro de Scorpiones que possui cromossomos holocêntricos. O número diploide nos butídeos varia de 2n=5 a 2n=56, sendo 2n=24 o mais frequentemente observado para as espécies da família. Adicionalmente, cerca de 1/3 dos butídeos examinados exibiram uma variação intraespecífica no número cromossômico, a qual pode envolver apenas um ou dois elementos, como em *Isometrus maculatus* (2n=12, 14) e *Lychas marmoreus* (2n=12, 14, 15) ou diversos elementos, como em *Tityus bahiensis* (2n=5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19) e *Uroplectes carinatus* (2n=20, 48) (Tabela 1).

Os cromossomos holocêntricos, como observados na família Buthidae, geralmente são caracterizados pela ausência de uma região centromérica pequena e bem definida, sendo que os microtúbulos do fuso de divisão ligam-se ao longo de todo o comprimento cromossômico, de maneira que os cromossomos e/ou cromátides movem-se paralelamente durante a anáfase, formando um ângulo reto com as fibras do fuso (Bongiorne et al. 2004). Os cromossomos holocêntricos também podem ser diferenciados dos monocêntricos quanto ao tamanho da região centromérica em relação

ao comprimento total do cromossomo, isto é, nos holocêntricos a porção do cromossomo que interage com os microtúbulos é grande, em contraste com os monocêntricos, nos quais esta região é pequena (Wolf 1996).

Os cromossomos holocêntricos foram descritos em diversas espécies de animais e plantas e parecem ser resultado de uma evolução convergente (John 1990; Dernburg 2001). Por outro lado, existe a hipótese de que os cromossomos holocêntricos originaram os monocêntricos, através da restrição da atividade cinética do cromossomo para uma região especializada, o centrômero (Moore et al. 1997). Nos aracnídeos, os cromossomos holocêntricos provavelmente tiveram origens independentes, levando-se em conta que estes ocorrem em grupos diferentes e não-relacionados, tais como ácaros (Wrensch et al. 1994), aranhas da superfamília Dysderoidea (Král et al. 2006) e escorpiões da família Buthidae (Schneider et al. 2009).

Os mecanismos que produzem alterações no número cromossômico parecem ser semelhantes para os cromossomos monocêntricos e holocêntricos (Luceño e Guerra 1996). No entanto, no caso dos cromossomos monocêntricos, determinados rearranjos podem originar segmentos cromossômicos acêntricos ou dicêntricos, os quais são usualmente perdidos durante a divisão celular. Por outro lado, todos os fragmentos cromossômicos gerados por rearranjos podem ter uma segregação normal em espécies que possuem cromossomos do tipo holocêntrico (Wolf 1996; Dernburg 2001).

Apesar da maioria dos rearranjos cromossômicos serem viáveis em espécies portadoras de cromossomos holocêntricos, a diversidade do número diploide é menor do que aquela esperada. Entre os escorpiões, variações cromossômicas intraespecíficas parecem ser mais acentuadas em espécies que possuem cromossomos monocêntricos, como exemplo, *Urodacus novaehollandiae* (Urodacidae), com 2n=66-175 (Shanahan 1989a), do que naquelas que apresentam cromossomos holocêntricos (Tabela 1).

Nas espécies da família Buthidae, além dos cromossomos holocêntricos, duas outras particularidades foram observadas durante a meiose masculina, ou seja, comportamento aquiasmático dos cromossomos e associações multivalentes heterozigotas, envolvendo translocações recíprocas ou fissões/fusões cromossômicas (Piza 1947a, b, c, 1948a, b, c, 1957; Sharma et al. 1959; Gupta e Sarker 1965; Shanahan 1989b; Moustafa et al. 2005; Schneider et al. 2009). É importante enfatizar que a presença de ambos, cromossomos holocêntricos e rearranjos heterozigotos, são extremamente raros para qualquer outro grupo de animais.

Entre os aracnídeos, Scorpiones é o único grupo no gual meiose masculina do tipo aquiasmática foi encontrada em todas as famílias. Existem várias hipóteses para explicar o significado evolutivo deste tipo particular de meiose, como a seleção favorecendo uma baixa frequência de recombinação (Altiero e Rebecchi 2003), e a preservação de certas combinações alélicas que estariam co-adaptadas e funcionariam como um super-gene (Ituarte e Papeschi 2004). Para os escorpiões, ainda não há dados suficientes para explicar o significado da meiose aquiasmática; no entanto, este tipo particular de meiose pode estar relacionado aos altos níveis de rearranjos cromossômicos heterozigotos presentes em espécies deste táxon. Os rearranjos principalmente aqueles presentes em condição heterozigota, cromossômicos. frequentemente acarretam em uma redução da fertilidade devido aos problemas meióticos (Fossey et al. 1989; Kingswood et al. 1994). No entanto, os efeitos prejudiciais dos rearranjos heterozigotos sobre a fertilidade podem ser diminuídos, quando os gametas não-balanceados são eliminados ou a frequência de recombinação cromossômica é drasticamente reduzida (Reed et al. 1992; Kingswood et al. 1994).

A ocorrência de altos índices de rearranjos cromossômicos heterozigotos em Buthidae também pode ter uma relação com a estrutura populacional e o padrão de dispersão de algumas espécies. Schneider et. al (2009) sugeriram que a grande

18

diversidade de número diploide e de configurações cromossômicas multivalentes observadas durante a meiose I de uma população de *Tityus bahiensis*, coletada em uma área urbana, pode ser resultado da alta incidência de endocruzamento entre os indivíduos. Tal endocruzamento pode ser mais frequente em espécies que ocupam ambientes modificados, as quais devido à abundância de alimento podem viver agregadas em um microhabitat e apresentar uma dispersão reduzida.

A maioria dos estudos citogenéticos em Buthidae foram realizados entre as décadas de 1940 à 1960, somente com técnicas de coloração convencional dos cromossomos e análise de poucos indivíduos. No entanto, a utilização de metodologias que identificam regiões cromossômicas específicas, como as de bandamento C, impregnação pelo íon prata, coloração com fluorocromos base-específicos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), além de fornecer dados adicionais sobre a estrutura dos cromossomos, podem auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pela variabilidade cariotípica neste grupo.

O emprego de análises cromossômicas ultraestruturais nos butídeos pode revelar, como em outros grupos de invertebrados, diversas particularidades concernentes a placa cinetocórica, como a presença de uma placa única que se estende pela maioria ou totalidade do comprimento cromossômico (Albertson e Thomson 1982), várias placas cinetocóricas localizadas ao longo do comprimento do cromossomo (Gama et al. 1981), uma placa cinetocórica que ocupa menos da metade da extensão cromossômica (Wolf et al. 1992) e, até mesmo, a ausência de placa cinetocórica (Shanahan e Hayman 1990; Schneider et al. 2009). Além disso, a análise do complexo sinaptonêmico e estruturas associadas em microscopia eletrônica de transmissão, em espécies de Buthidae é imprescindível para interpretar os rearranjos cromossômicos bem como para confirmar a ausência de *crossing-over*, uma vez que a falta de quiasmas

em células observadas em microscopia de luz não implica necessariamente na ausência de recombinação gênica.

Espécie	2n	Tipo de Cromossomo	Procedência	Referência
Ananteris balzanii (Thorell, 1891)	12		Brasil	Piza (1947a)
Androctonus amoreuxi (Audouin, 1826)	24	Holocêntrico	Egito	Moustafa et al. (2005)
Androctonus australis (Linnaeus, 1758)	24	Holocêntrico	Egito	Moustafa et al. (2005)
Androctonus bicolor (Ehrenberg, 1828)	24	Holocêntrico	Egito	Moustafa et al. (2005)
Androctonus crassicauda (Olivier, 1807)	24	Holocêntrico	Egito	Moustafa et al. (2005)
Androctonus mauritanicus (Pocock, 1902)	24		)	Moustafa et al. (2005)
Buthus europaeus	22			Makino (1956)
Buthus occitanus (Amoreux, 1789)	22		França	Guénin (1961)
Centruroides exilicauda (Wood, 1863)	26			Wilson (1931)
Centruroides vittatus (Say, 1821)	26	Holocêntrico	Estados Unidos	Riess et al. (1978)
Hemilychas alexandrinus (Hirst, 1911)	14	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Hottentotta trilineatus (Peters, 1861)	24		Zimbábue	Newlands e Martindale (1980)
Isometroides vescus (Karsch, 1880)	14	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Isometrus maculatus (DeGeer, 1778)	12	Holocêntrico	Brasil	Piza (1947b)
I. maculatus (DeGeer, 1778)	12	Holocêntrico	Brasil	Piza (1955)
I. maculatus (DeGeer, 1778)	12		Brasil	Piza (1950a)
I. maculatus (DeGeer, 1778)	14	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Isometrus melanodactylus (L. Koch, 1867)	14	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Lychas marmoreus (C. L. Koch, 1844)	12, 14, 15	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Lychas variatus (Thorell, 1876)	14, 16	Holocêntrico	Austrália	Shanahan (1989b)
Mesobuthus macmahoni (Pocock, 1900)	24		Índia	Sharma et al. (1959)
Mesobuthus martensii (Karsch, 1879)	24			Makino (1956)
M. martensii (Karsch 1879)	24		China	Sato (1940)
Mesobuthus tamulus	22	Holocêntrico	Índia	Sharma et al. (1959)
M. tamulus	20-28	Holocêntrico	Índia	Venkatanarasimhiah e Rajasekarasetty (1964)
M. tamulus	24	Holocêntrico	Índia	Gupta e Sarker (1965)
Odontobuthus doriae (Thorell, 1876)	22		Índia	Sharma et al. (1959)
Parabuthus mossambicensis (Peters, 1861)	36		Zimbábue	Newlands e Martindale (1980)
Parabuthus raudus (Simon, 1888)	18		Zimbábue	Newlands e Martindale (1980)
Parabuthus transvaalicus (Purcell, 1899)	20		Zimbábue	Newlands e Martindale (1980)
Rhopalurus rochai (Borelli, 1910)	28		Brasil	Piza (1957)
Tityus bahiensis (Perty, 1833)	6	Holocêntrico	Brasil	Piza (1947c)
T. bahiensis (Perty, 1833)	9	Holocêntrico	Brasil	Piza (1939a)
T. bahiensis (Perty, 1833)	9	Holocêntrico	Brasil	Piza (1939b)
T. bahiensis (Pertv. 1833)	6, 9, 18	Holocêntrico	Brasil	Piza (1940)
T. bahiensis (Pertv, 1833)	9	Holocêntrico	Brasil	Brieger e Graner (1943)
T. bahiensis (Pertv. 1833)	5	Holocêntrico	Brasil	Piza (1944)
T. bahiensis (Pertv. 1833)	6, 10	Holocêntrico	Brasil	Piza (1943a)
T. bahiensis (Pertv. 1833)	9	Holocêntrico	Brasil	Piza (1943b)
T. bahiensis (Perty, 1833)	7, 9	Holocêntrico	Brasil	Piza (1948c)
T. bahiensis (Perty, 1833)	9, 10	Holocêntrico	Brasil	Piza (1948b)
T. bahiensis (Perty, 1833)	17, 18, 19	Holocêntrico	Brasil	Piza (1949)
T. bahiensis (Perty, 1833)	9, 10	Holocêntrico	Brasil	Piza (1950a)
T. bahiensis (Pertv, 1833)	10	Holocêntrico	Brasil	Takahashi (1976)

Tabela 1 - Informações citogenéticas das espécies da família Buthidae (Schneider et al. 2012). 2n=número diploide. Parênteses = número diploide em fêmeas.

21

Piza (1950b)	Cunha e Pavan (1954)	Schneider et al. (2009)	Kovarík et al. (2009)	Piza (1947a)	Piza (1952)	Piza (1950b)	Piza (1947a)	Schneider e Cella (2010)	Piza (1950b)	Piza (1948a)	Kovarík et al. (2009)	Newlands e Martindale (1980)	Newlands e Martindale (1980)	Newlands e Martindale (1980)	Newlands e Martindale (1980)	Newlands e Martindale (1980)	Newlands e Martindale (1980)
Brasil	Brasil	Brasil		Brasil	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil		Zimbábue	Zimbábue	Zimbábue	Zimbábue	Zimbábue	Zimbábue
Holocêntrico	Holocêntrico	Holocêntrico	Holocêntrico					Holocêntrico			Holocêntrico	-		-			ł
9, 10, 12, 16	10	5, 6, 9, 10	20	20	15, 16	26, 27	(12)	12	(16)	14	20	20, 48	20	26	24	22	24
T. bahiensis (Perty, 1833)	T. bahiensis (Perty, 1833)	T. bahiensis (Perty, 1833)	Tityus magnimanus (Pocock, 1897)	Tityus matogrossensis (Borelli, 1901)	Tityus metuendus (Pocock, 1897)	Tityus neglectus (Mello-Leitão, 1932)	Tityus serrulatus (Lutz & Mello, 1922)	T. serrulatus (Lutz & Mello, 1922)	Tityus stigmurus (Thorell, 1876)	Tityus trivittatus (Kraepelin, 1898)	Tityus ythieri (Lourenço, 2007)	Uroplectes carinatus (Pocok, 1890)	Uroplectes chubbi (Hirst, 1911)	Uroplectes flavoviridis (Peters, 1861)	Uroplectes olivaceus (Pocock, 1896)	Uroplectes planimanus (Karsch, 1879)	Uroplectes vittatus (Thorell, 1876)

#### 2. OBJETIVOS

Considerando as particularidades cromossômicas verificadas nos Scorpiones, em especial nos representantes da família Buthidae, a diversidade de espécies na fauna brasileira e a escassez de estudos citogenéticos atuais neste grupo, o objetivo deste trabalho é caracterizar citogeneticamente 11 espécies de Buthidae (Ananteris balzanii, Rhopalurus agamemnon, Rhopalurus rochai, Tityus bahiensis, Tityus confluens, Tityus costatus, Tityus fasciolatus, Tityus maranhensis, Tityus martinpaechi, Tityus paraguayensis e Tityus stigmurus), visando estabelecer os mecanismos envolvidos com a variabilidade inter e intraespecífica de número diploide e/ou origem das associações multivalentes complexas, bem como, a evolução dos cromossomos holocêntricos. Para tal, os cromossomos mitóticos e meióticos de diferentes espécies foram analisados em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, para estabelecer:

> a) O número diploide de cada espécie, através do emprego da técnica de coloração convencional com Giemsa;

> b) O comportamento dos cromossomos durante a meiose quanto a sinapse, recombinação e segregação;

> c) O padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)
> com a técnica de impregnação pelo íon prata e FISH com sonda de rDNA;

 d) O padrão de distribuição e composição das regiões de heterocromatina constitutiva através da técnica de bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos;

 e) A organização e o comportamento do complexo sinaptonêmico e estruturas associadas.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### **3.1. MATERIAL**

O número de exemplares machos e fêmeas adultos das 11 espécies da família Buthidae analisados nessa dissertação e seus respectivos locais de coleta estão listados na Tabela 2.

A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada pela pesquisadora MSc. Denise Maria Candido, do Instituto Butantan, São Paulo, SP, e pelo Prof. MSc. Leonardo Sousa Carvalho, da Universidade Federal do Piauí, UFPI, Floriano, PI. Os exemplares foram depositados no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan (IBSP curadora D. M. Barros-Battesti) e na Coleção de História Natural, UFPI (CHNUFPI curador L. S. Carvalho).

**Tabela 2** – Escorpiões butídeos analisados neste trabalho, incluindo o número de espécimes e o local de coleta nos estados brasileiros: BA=Bahia, CE=Ceará, MG=Minas Gerais, PI=Piauí, PR=Paraná, SP=São Paulo, TO=Tocantins.

Espécie	Número de	Local de Coleta					
	Indivíduos						
Ananteris balzanii Thorell, 1981	2 machos	Guanambi (14°17'S, 42°44'W), BA					
	1 macho	Rio Claro (22°24'S, 47°33'W), SP					
Rhopalurus agamemnon (C. L. Koch, 1839)	3 machos	Mateiros (10°33'S, 46°27'W), TO					
	1 macho/2 fêmeas	Teresina (05º05'S, 42º48'W), PI					
Rhopalurus rochai Borelli, 1910	2 machos /2 fêmeas	Castelo do Piauí (05º14'S, 41º41'W), Pl					
	2 machos	Guanambi (14º18'S, 42º44'W), BA					
Tityus (Archaeotityus)							
Tityus maranhensis Lourenço de Jesus	5 machos/7 fêmeas	Floresta Nacional de Palmares (05º03'S, 42º35'W),					
Junior e Limeira-de-Oliveira, 2006		Altos, Pl					
<i>Tityus paraguayensis</i> Kraepelin, 1895	4 machos/8 fêmeas	Ilha São Francisco (18º58'S, 49º28'W), Guaíra, PR					
Tityus (Tityus)							
Tityus bahiensis (Perty, 1833)	7 machos/5 fêmeas	Ilha Grande (24°1'S, 54°10'W), Guaíra, PR					
	4 machos	Estação Ecológica de Santa Bárbara (24º48'S,					
		49º13'W), Águas de Santa Bábara, SP					
Tityus confluens Borelli, 1899	2 machos	Guadalupe (06º51'S, 43º27'W), Pl					
<i>Tityus costatus</i> (Karsch, 1879)	1 fêmea	Palmeira (25º26'S, 49º59'W), PR					
Tityus fasciolatus Pessôa, 1935	10 machos/6 fêmeas	Ituiutaba (18º58'S, 49º28'W), MG					
Tityus martinpaechi Lourenço, 2001	2 machos/1 fêmea	Serra da Ibiapaba (03º49'S, 40º59'W), Ubajara CE					
Tityus stigmurus (Thorell, 1876)	3 fêmeas	Floresta Nacional do Araripe (07º22'S, 39º19'W),					
		Barbalha, CE					

#### 3.2. MÉTODOS

#### 3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações citológicas para estudo dos cromossomos mitóticos e meióticos, em microscopia de luz, foram obtidas de testículos e ovários de indivíduos adultos, de acordo com a metodologia descrita a seguir: a) Dissecar o animal em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,72g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em 1 litro de água destilada), retirar as gônadas e colocá-las em uma placa escavada, contendo solução fisiológica e solução hipotônica (água de torneira), durante 12 minutos; b) Transferir o material para uma placa escavada, contendo fixador Carnoy I (metanol e ácido acético – 3:1) e deixar durante 30 minutos, no mínimo; c) Macerar parte do material, sobre uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 45 ou 60%; d) Secar a lâmina em uma placa de metal à temperatura de 35 a 40°C.

## 3.2.2. Coloração convencional (Giemsa)

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

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

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

## 3.2.4. Técnica de obtenção das bandas C

As regiões de heterocromatina constitutiva foram identificadas através da técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações: a) Hidrolisar as lâminas em solução de ácido clorídrico 0,1N à temperatura ambiente, por cinco minutos; b) Tratar as preparações cromossômicas com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante aproximadamente 30 segundos, à temperatura de 60°C; c) Lavar as lâminas, duas vezes, em solução de ácido clorídrico 0,1N, à temperatura ambiente; d) Lavar as lâminas em tampão 2xSSC (17,5g de NaCl, 8,8g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, completar para 1000mL de água Mili-Q e ajustar o pH para 7,0), à temperatura ambiente; e) Incubar as lâminas em tampão 2xSSC, por 30 minutos, à temperatura de 60°C; f) Lavar as lâminas várias vezes com água destilada e secar ao ar; g) Adicionar 20 $\mu$ L de solução de DAPI/Vectashield sobre as lâminas e cobrir com lamínula.

#### 3.2.5. Colorações associadas

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

# 3.2.6. Técnica de marcação com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI)

Para identificação das regiões da cromatina ricas em sequências de bases AT e GC, foi utilizada a metodologia descrita por Christian et al. (1998), com algumas modificações: a) Incubar a lâmina em solução de formamida à 70%, diluída em 2xSSC, à 70°C por cerca de dois minutos; b) Lavar as lâminas em dois banhos de 2xSSC, à temperatura ambiente, por dois minutos cada; c) Desidratar a lâmina em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%), por dois minutos cada; d) Secar a lâmina à temperatura ambiente; e) Adicionar 80µL de CMA<sub>3</sub> (20µg/mL em MgCl<sub>2</sub> a 32mM) sobre a lâmina e cobrir com lamínula; f) Deixar a lâmina em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos; g) Retirar a lamínula e lavar as lâminas três vezes em 1xPBS (7,58g de NaCl, 0,993g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,414g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, completar para o volume de 1000mL com água Mili-Q) à temperatura ambiente, por 2 minutos cada; h) Adicionar sobre a lâmina 20µL de DAPI/Vectashield e cobrir com lamínula; i) Aguardar alguns minutos, retirar o excesso de líquido com papel filtro e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adeguados.

# 3.2.7. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 45S pDm 238

A localização dos sítios de rDNA 45S foi realizada através da técnica de FISH descrita por Pinkel et al. (1986), com modificações propostas por Silva et al. (2012): a) Marcar as sondas com digoxigenina 11-dUTP por Nick Translation; b) Desidratar cada lâmina em uma série de álcool 70%, 90% e 100%, durante 5 minutos cada, e secar ao ar; c) Pipetar 100µL de RNase (10mg/mL), colocar sobre a lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 1 hora, em câmara úmida, à 37°C; d) Lavar as lâminas em três banhos de 2xSSC, por cinco minutos cada; e) Lavar as lâminas em Triton 1X, durante cinco

minutos; f) Desidratar as preparações citológicas em álcool 70%, 90% e 100%, durante cinco minutos cada, e secar as lâminas à temperatura ambiente; q) Desnaturar o DNA cromossômico em formamida 70%, diluída em 2xSSC, por cerca de dois minutos, à 70°C; h) Desidratar cada lâmina em uma série de álcool, 70%, 90% e 100%, durante cinco minutos cada, à -20°C, e secar ao ar; i) Enquanto as lâminas são passadas na série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação (6µL da sonda marcada e 24µL de tampão de hibridização) em termociclador à 95°C, por 10 minutos; j) Adicionar 12µL da solução de hibridização sobre a lâmina, cobrir com lamínula, e deixar em câmara úmida à 37°C overnight; k) Retirar as lamínulas em 2xSSC à temperatura ambiente; l) Lavar as lâminas em 0,4xSSC + 0,3% Triton à 70°C, por dois minutos; m) Lavar as lâminas em 2xSSC + 0,1% Triton por dois minutos cada, à temperatura ambiente; n) Colocar, sobre cada lâmina, 30µL de tampão de bloqueio (1000µL de 2xSSC + 10µL de Triton 100X + 0,05g de leite em pó desnatado), cobrir com lamínula e incubar por cinco minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente; o) Retirar a lamínula e enxaguar as lâminas em 2xSSC, à temperatura ambiente; p) Incubar cada lâmina com 4µL de antidigoxigenina+rodamina e 26µL de tampão de bloqueio, durante uma hora, em câmara úmida escura, à temperatura ambiente; q) Lavar as lâminas em 2xSSC à 43°C, por dois minutos; r) Lavar as lâminas em dois banhos de 2xSSC +Triton 0,1%, à 43°C, durante dois minutos; s) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100%, por cinco minutos, e secar ao ar; t) Colocar sobre cada lâmina 20µL de solução de DAPI/Vectashield, cobrir com lamínula, retirar o excesso com papel filtro, e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

Alternativamente, algumas preparações cromossômicas foram submetidas à técnica descrita por Cabral-de-Mello et al. (2010): a) Fixar as lâminas em Carnoy I, por 15 minutos, e desidratá-las em série alcoólica 70% e 100%, por cinco minutos cada; b) Secar as lâminas, à 37°C; c) Incubar as lâminas com 100µL de solução de RNAse, por

uma hora em câmara úmida à 37°C; d) Lavar as lâminas três vezes em 2xSSC, por cinco minutos cada; e) Incubar as lâminas em solução de formaldeído 37%, por 10 minutos, à temperatura ambiente; f) Lavar as lâminas duas vezes em 2xSSC, por cinco minutos cada; g) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70% e 100%, por cinco minutos cada; h) Secar as lâminas à 37°C; h) Preparar a solução de hibridação: em um tubo contendo 5µL de sonda, adicionar 12,5µL de formamida 50%, 5µL de sulfato de dextrano 50% e 2,5µL de 20xSSC; i) Desnaturar a sonda à 95°C por 10 minutos e passar rapidamente para o gelo; j) Colocar sobre a lâmina 30µL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a mesma; k) Desnaturar os cromossomos e a sonda em banho-maria, à 75°C, por cerca de cinco minutos; I) Manter as lâminas em câmara úmida, contendo 2xSSC, à 37ºC overnight; m) Retirar a lamínula e mergulhar as lâminas em 2xSSC, à temperatura ambiente, por aproximadamente cinco minutos; n) Incubar as lâminas duas vezes em 2xSSC, à 42°C, por cinco minutos cada; o) Incubar as lâminas duas vezes em 0,1xSSC, à 42°C, por cinco minutos cada; p) Incubar as lâminas em 2xSSC, à temperatura ambiente, por 10 minutos; q) Transferir as lâminas para PBD (20mL de 20xSSC, 0,5mL de Triton, 1g de leite em pó desnatado, água destilada até completar 100mL), à temperatura ambiente; r) Aplicar sobre cada lâmina 100µL da solução com os anticorpos primários (100µL de PBD + 1µL de Alexa); s) Incubar as lâminas, por uma hora, em câmara úmida, à 37°C; t) Remover a lamínula e lavar três vezes em 1xPBD, à 45°C, por cinco minutos cada; u) Montar a lâmina com 20µL de DAPI/Vectashield, cobrir com lamínula, retirar o excesso com papel filtro, e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

#### 3.2.8. Análises cromossômicas em microscopia de luz

As análises dos cromossomos corados convencionalmente ou submetidos à técnica de impregnação pelo íon prata, foram realizadas em microscopia de luz. As

melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em um fotomicroscópio Olympus BX51, com objetiva 100x sob imersão, optovar 1,6 utilizando o software DP Controller. As células submetidas ao bandamento C, coloração com fluorocromos baseespecíficos, e FISH foram fotografadas com os filtros específicos para os fluorocromos DAPI (360-390nm), CMA<sub>3</sub> (430-480nm) e Rodamina (540-625nm).

#### 3.2.9. Obtenção e análise do complexo sinaptonêmico

Os microestendidos celulares para análise do complexo sinaptonêmico foram obtidos, seguindo a metodologia descrita por Loidl e Jones (1986): a) Dissecar o animal e retirar os testículos e, sobre um pedaço de Parafilm, macerá-los em solução fisiológica para insetos, com o auxílio de uma lâmina de barbear; b) Pingar três a quatro gotas de solução de lipsol 0,5% em uma lâmina, previamente revestida com uma película plástica (passar a lâmina em uma solução contendo 100mL de clorofórmio PA. e 0,7g de plástico "Falcon"), adicionar uma gota do macerado testicular e esperar seis minutos; c) Colocar sete a oito gotas de solução de paraformaldeído a 4% e sacarose 0,1M; d) Deixar a lâmina secar durante aproximadamente 24 horas, passá-la rapidamente em água destilada e secar ao ar. As lâminas contendo os microestendidos celulares foram impregnadas pelo nitrato de prata, segundo o item 3.2.3, com substituição da lamínula por um tecido de nylon. A película plástica contendo os microestendidos foi colocada sobre uma telinha de cobre (50 mesh), a qual foi analisada em um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100. O filme empregado para o registro fotográfico foi o Kodak 4489 e as ampliações fotográficas foram feitas em papel Kodabrome Print RC-F3 (Kodak) e reveladas em D72, diluído em água, na proporção 1:2.

## 4. **RESULTADOS**

Os resultados obtidos com a análise citogenética de 11 espécies de escorpiões da família Buthidae são apresentados na forma de três artigos, mencionados a seguir:

**Artigo I** – High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions (aceito para publicação no periódico Chromosome Research – DOI: 10.1007/s10577-013-9342-3);

**Artigo II** – Localização dos genes de rDNA 45S em cromossomos mitóticos e meióticos de escorpiões da família Buthidae

**Artigo III** – Organização e comportamento do complexo sinaptonêmico durante a meiose aquiasmática de escorpiões Buthidae



Ananteris balzanii (Foto: D. M. Candido)
Rhopalurus agamemnon (Foto: T. J. Porto)
Rhopalurus rochai (Foto: T. J. Porto)
Tityus bahiensis (Foto: E. Wienskoski)



High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions

Viviane Fagundes Mattos<sup>1\*</sup>, Doralice Maria Cella<sup>1</sup>, Leonardo Sousa Carvalho<sup>2</sup>, Denise Maria Candido<sup>3</sup>, and Marielle Cristina Schneider<sup>4\*</sup>

1. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Avenida 24-A, 1515, Caixa Postal 199, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

2. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Campus Amílcar Ferreira Sobral, BR 343, km 3.5, 64800-000, Floriano, Piauí, Brazil.

Instituto Butantan, Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Avenida Vital Brazil,
1500, 05503-900, São Paulo, Brazil.

4. Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Ciências Biológicas,

Av. Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270, Diadema, São Paulo, Brazil.

Running title: High chromosome variability in buthid scorpions

\*Corresponding authors. Tel.: +551935264140; Fax: +551935264136

E-mail: vivianefagundesmn@hotmail.com; marielle.unifesp@gmail.com

#### RESUMO

Neste estudo, nós investigamos os cromossomos mitóticos e meióticos de 11 espécies de escorpiões da família Buthidae, pertencentes a três gêneros (Ananteris, Rhopalurus e Tityus), visando obter um conhecimento detalhado em relação aos mecanismos responsáveis pela diversidade intraespecífica e/ou interespecífica de número cromossômico e origem das complexas associações multivalentes observadas durante a meiose. Os cromossomos de todas as espécies não exibiram uma região centromérica localizada e apresentaram comportamento sináptico e aquiasmático durante a meiose I. Metáfases espermatogoniais e oogoniais desses butídeos mostraram número diploide variável entre 2n=6 a 2n=28. Na maioria das espécies, associações cromossômicas multivalentes foram observadas em núcleos paquitênicos e pós-paquitênicos. Além disso, uma variabilidade intraespecífica quanto à presença ou ausência de cadeias cromossômicas, e quanto ao número de cromossomos envolvidos nas complexas configurações multivalentes foram observados em algumas espécies desses três gêneros. Células impregnadas pelo íon prata revelaram que o número e a localização das regiões organizadoras nucleolares (RONs) permaneceram inalterados apesar da extensa variação cromossômica; notavelmente, duas RONs localizadas nas regiões terminal ou subterminal dos cromossomos foram comumente observadas em todas as espécies. Células submetidas às técnicas de bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos mostraram que as espécies que exibiram blocos conspícuos de heterocromatina possuíam os menores índices de rearranjos cromossômicos. Levando-se em conta a análise de células mitóticas e meióticas, foi possível determinar que a variabilidade intraespecífica ocorreu como uma consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fissão/fusão nas espécies de Ananteris e Tityus e devido a translocações recíprocas nas espécies do gênero Rhopalurus. Adicionalmente, verificamos que indivíduos que possuem mesmo número diploide podem diferir quanto a
organização estrutural dos cromossomos, o que resulta em diferentes associações cromossômicas nas células meióticas (elementos semelhantes a bivalentes ou cadeias cromossômicas).

Palavras-chave: evolução, heterozigosidade, holocêntrico, meiose, rearranjos cromossômicos, região organizadora de nucléolo

# ABREVIAÇÕES

- C = Cadeia cromossômica
- CV = Coeficiente de variação
- DSL = Comprimento do conjunto diploide
- NOR = Região organizadora de nucléolo
- II = "Bivalente" ou elemento como bivalente
- CIII = Cadeia de três cromossomos
- CIV = Cadeia de quatro cromossomos
- CVI = Cadeia de seis cromossomos
- CVIII = Cadeia de oito cromossomos
- CX = Cadeia de 10 cromossomos
- CXXVIII = Cadeia de 28 cromossomos
- $CMA_3 = Cromomicina A_3$
- DAPI = 4'-6-diamidino-2-fenilindol

# ABSTRACT

In this study, we investigated the mitotic and meiotic chromosomes of 11 Buthidae scorpion species, belonging to three genera (Ananteris, Rhopalurus, and Tityus), to obtain detailed knowledge regarding the mechanisms underlying the intraspecific and/or interspecific diversity of chromosome number and the origin of the complex chromosome associations observed during meiosis. The chromosomes of all species did not exhibit a localised centromere region and presented synaptic and achiasmatic behaviour during meiosis I. Spermatogonial and/or oogonial metaphase cells of these buthids showed diploid numbers range from 2n=6 to 2n=28. In most species, multivalent chromosome associations were observed in pachytene and postpachytene nuclei. Moreover, intraspecific variability associated with the presence or absence of chromosome chains and the number of chromosomes in the complex meiotic configurations was observed in some species of these three genera. Silver-impregnated cells revealed that the number and location of nucleolar organiser regions (NORs) remained unchanged despite extensive chromosome variation; notably, two NORs located on the terminal or subterminal chromosome regions were commonly observed for all species. C-banded and fluorochrome-stained cells showed that species with conspicuous blocks of heterochromatin exhibited the lowest rate of chromosomal rearrangement. Based on the investigation of mitotic and meiotic cells, we determined that the intraspecific variability occurred as a consequence of fission/fusion-type chromosomal rearrangements in Ananteris and Tityus species, and reciprocal translocation in Rhopalurus species. Furthermore, we verified that individuals presenting the same diploid number differ in structural chromosome organisation, giving rise to intraspecific differences of chromosome association in meiotic cells (bivalent-like elements or chromosome chains).

Keywords: chromosome rearrangements, evolution, heterozygosity, holocentric, meiosis, nucleolar organiser region

# ABBREVIATIONS

- C = Chromosome chain
- CV = Coefficient of variation
- DSL = Diploid set length
- NOR = Nucleolar organiser region
- II = "Bivalent" or bivalent-like element
- CIII = Chain of three chromosomes
- CIV = Chain of four chromosomes
- CVI = Chain of six chromosomes
- CVIII = Chain of eight chromosomes
- CX = Chain of 10 chromosomes
- CXXVIII = Chain of 28 chromosomes
- $CMA_3 = Chromomycin A_3$
- DAPI = 4'-6-diamidino-2-phenylindole

# INTRODUCTION

Buthidae is the largest family of extant scorpions, comprising approximately 960 species and 89 genera (Rein 2012). This family is widely distributed on all continents except Antarctica. Some buthid genera are widespread throughout distinct geographical regions, such as *Ananteris*, which has been identified in Africa and South America, whereas others are endemic, such as *Rhopalurus* and *Tityus*, which have only been identified in South America and Central America (Soleglad and Fet 2003). Pre-cladistic studies concerning the relationships within the order Scorpiones have indicated Buthidae as a separate lineage from the other scorpion families. This hypothesis has been supported through biochemical, morphological, and molecular data, and Buthidae is considered the most basal group of the 18 extant scorpion families (Prendini and Wheeler 2005).

Most of the cytogenetic information on Scorpiones has been obtained from Buthidae, with data on 40 species belonging to 15 genera (Schneider et al. 2012); however, thus far, the number of buthids cytogenetically analysed corresponds to less than 5% of the known species. The available cytogenetic data also seems to confirm the monophyly of Buthidae, as among the nine Scorpiones families, this is the only group that exhibits holocentric chromosomes. The diploid number in Buthidae ranges from 2n=5 to 2n=56, but 2n=24 is the most common chromosome number observed for this family (Schneider et al. 2012). With the exception of *Androctonus* and *Centruroides*, with 2n=24 and 2n=26, respectively, the diploid numbers in the other genera vary among species, e.g., 2n=22-56 in *Buthus*, 2n=12-14 in *Isometrus*, 2n=12-16 in *Lychas*, 2n=20-28 in *Mesobuthus*, 2n=18-36 in *Parabuthus*, 2n=5-27 in *Tityus*, and 2n=20-48 in *Uroplectes*. The other six genera contain only one chromosomally analysed species, with 2n=12 in *Ananteris balzanii*, 2n=14 in *Hemilychas alexandrinus*, 2n=24 in *Hottentotta trilineatus*, 2n=14 in *Isometroides vescus*, 2n=22 in *Odontobuthus doriae*, and 2n=28 in *Rhopalurus rochai* (Makino 1956; see Schneider et al. 2012). In addition to this high interspecific diversity, approximately 1/3 of the buthids presented intraspecific variability (intrapopulational and/or interpopulational) in chromosome number, which might involve one or two elements, such as in *Isometrus maculatus* (2n=12, 14) and *Lychas marmoreus* (2n=12, 14, and 15), or many chromosomes, such as in *Tityus bahiensis* (2n=5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 18, and 19) (see Schneider et al. 2012).

The occurrence of achiasmatic meiosis is a feature registered in Buthidae as well as in all cytogenetically analysed scorpion species (Schneider et al. 2009a). This type of meiosis is characterised by the absence of crossing-over and typical substages of diplotene and diakinesis - crossing-over is one of the mechanisms responsible for the genetic variability in most organisms. In bisexual species, achiasmatic meiosis is typically restricted to only one sex, the heterogametic sex (John 1990; Marec et al. 2010). The presence of multivalent chromosome associations is another intriguing characteristic frequently verified during the meiosis of male scorpions. In Buthidae, these complex chromosome configurations were observed in approximately 50% of the examined species. Interestingly, in most cytogenetic studies, only one individual has been analysed, indicating that the intrapopulational diversity regarding to the chromosomal rearrangement rates and, consequently, the multivalent associations, are underestimated within Buthidae. Surprisingly, the number of chromosomes involved in multivalent associations varies not only among individuals but also within each individual, as observed in Tityus bahiensis, with 2n=6, showing postpachytene cells with three "bivalents" or one chromosomal chain comprising six chromosomes (Schneider et al. 2009b). Considering that most chromosome studies in Buthidae have been performed on a small sample of specimens and using standard staining techniques, the chromosomal rearrangements originating these multivalent configurations have been elucidated only in some species and are associated with the occurrence of reciprocal translocations (Shanahan 1989a) or chromosomal fission/fusion (Schneider et al. 2009b).

In the present study, a detailed cytogenetic analysis of 11 Buthidae species was performed using standard and differential techniques to characterise the chromosomal diversity and clarify the rearrangements responsible for intraspecific and interspecific chromosome variability. To investigate a wide-ranging sample of scorpions, the species examined in this study belong to three of the richest and most distinct genera (*Ananteris, Rhopalurus,* and *Tityus*) in the Brazilian fauna. Furthermore, the *Tityus* species examined here are from two different subgenera, namely, *Archaeotityus* and *Tityus* (Lourenço 2006).

### MATERIALS AND METHODS

A sample of 78 scorpions of the family Buthidae was investigated in this study. The data concerning the number of individuals analysed and the collection localities are listed in Table 1. The vouchers were deposited in the Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, state of São Paulo, Brazil (IBSP, curator D. M. Barros-Battesti) and Coleção de História Natural, Universidade Federal do Piauí, Floriano, state of Piauí, Brazil (CHNUFPI, curator L. S. Carvalho). The species analysed in this study were assigned to well-described species documented in reliable taxonomic literature (i.e., Lourenço 2002; Lenarducci et al. 2005; Souza et al. 2006, 2009). Nevertheless, a taxonomically conservative approach was employed concerning the identification of the specimens belonging to the complex "*Tityus confluens*". The specimens were determined as *Tityus confluens* according to the lack of distinctive characters of other described species (for a detailed discussion, see Lourenço et al. 2004; Bertani et al. 2005; Lourenço et al. 2006; Lourenço and Aparecida-da-Silva 2007).

All individuals were dissected in a saline solution (128.3 mM NaCl, 16.7 mM  $Na_2HPO_4$ , and 19.9 mM  $KH_2PO_4$ ). The testes and ovaries were removed and treated with hypotonic solution (1:1 saline solution: tap water) for 12 min and fixative solution (3:1

40

methanol: acetic acid) for at least 30 min. For the slide preparations, one fragment of the gonads was macerated in 45% or 60% acetic acid solution to obtain a cell suspension. This suspension was spread onto a slide, which was dried on a metal plate at 35-40°C. The chromosome preparations were standard-stained using 3% Giemsa solution (3% commercial Giemsa solution and 3% phosphate buffer, pH 6.8, in distilled water), silver-impregnated (Howell and Black 1980) to detect the nucleolar organiser regions (NORs), C-banded (Sumner 1972) and subsequently stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to identify the constitutive heterochromatin regions. Additionally, to visualise the AT- and GC-rich chromatin regions, some cytological preparations were stained with DAPI and chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) according to Christian et al. (1998). The images of mitotic and meiotic cells were captured using an Olympus BX51 light microscope coupled to an Olympus DP71 digital camera with the DP Controller software.

The average diploid set length (DSL) was calculated for three *T. maranhensis* males and one *T. paraguayensis* male, which presented intra-individual variability in the number of chromosomal structures ("bivalents" and chromosomal chains) observed in postpachytene spermatocytes. To determine the DSL, chromosomal elements of 60 and 25 postpachytene cells of *T. maranhensis* and *T. paraguayensis*, respectively, were measured, using the Image J software (Image Processing and Analysis in Java) developed at the Research Services Branch of the US National Institute of Mental Health. The coefficient of variation (CV=standard deviation divided by the average and multiplied by 100) of the DSL was calculated to compare the obtained values. Considering that the degree of chromosome condensation among the cells was heterogeneous, we considered differences in the CV values of up to 20% as statistically significant, in accordance with the suggestion of Gomes (1982).

**Table 1.** Buthidae scorpions analysed in this study, including the number of specimens and the collection localities in Brazilian states: BA=Bahia, CE=Ceará, MG=Minas Gerais, PI=Piauí, PR=Paraná, SP=São Paulo, TO=Tocantins.

Species	Number of individuals	Collection localities
Ananteris balzanii Thorell, 1981	2 males	Guanambi (14º17'S, 42º44'W), BA
	1 male	Rio Claro (22º24'S, 47º33'W), SP
Rhopalurus agamemnon (C. L. Koch, 1839)	3 males	Mateiros (10º33'S, 46º27'W), TO
	1male/2 females	Teresina (05º05'S, 42º48'W), PI
Rhopalurus rochai Borelli, 1910	2 males/2 females	Castelo do Piauí (05º14'S, 41º41'W), PI
	2 males	Guanambi (14º18'S, 42º44'W), BA
Tityus (Archaeotityus)		
Tityus maranhensis Lourenço de Jesus	5 males/7 females	Floresta Nacional de Palmares (05º03'S, 42º35'W),
Junior and Limeira-de-Oliveira, 2006		Altos, Pl
<i>Tityus paraguayensis</i> Kraepelin, 1895	4 males/8 females	Ilha São Francisco, Guaíra (18º58'S, 49º28'W), PR
Tityus (Tityus)		
Tityus bahiensis (Perty, 1833)	7 males/5 females	Ilha Grande, Guaíra (24º1'S, 54º10'W), PR
Tityus confluens Borelli, 1899	2 males	Guadalupe (06°51'S, 43°27'W), PI
Tityus costatus (Karsch, 1879)	1 female	Palmeira (25º26'S, 49º59'W), PR
Tityus fasciolatus Pessôa, 1935	10 males/6 females	Ituiutaba (18º58'S, 49º28'W), MG
Tityus martinpaechi Lourenço, 2001	2 males/1 female	Serra da Ibiapaba, Ubajara (03º49'S, 40º59'W), CE
Tityus stigmurus (Thorell, 1876)	3 females	Floresta Nacional do Araripe (07º22'S, 39º19'W),
		Barbalha, CE

## RESULTS

### **Conventional Giemsa staining**

The chromosomes of all the Buthidae representatives studied in this work were considered holocentric due to the lack of primary constriction and the localised centromere region. Moreover, male meiosis was classified as synaptic and achiasmatic because the chromosomes were paired during the pachytene stage, and the bivalents did not exhibit a chromosomal configuration indicative of crossing-over. The intraspecific variability of the diploid number was not observed in the buthid samples analysed; however, multivalent configurations formed from a variable number of chromosomes were verified in the postpachytene cells of most species (Table 2). Cytogenetic preparations of the female individuals did not show cells in meiotic division.

The spermatogonial metaphase cells of *A. balzanii* of the two localities showed 2n=14 (Fig. 1a). The pachytene cells presented seven double filaments, indicating the total synapsis of the chromosomes (Fig. 2a). In the sample from Guanambi, one individual exhibited postpachytene cells with seven "bivalents" (Fig. 2b), and other male showed postpachytene nuclei with five "bivalents" plus one chromosome chain (C) comprising four chromosomes (5II+CIV) (Fig. 2c). Secondary spermatocytes had n=7 chromosomes (Fig. 2d).

The spermatogonial and oogonial cells of both *R. agamemnon* and *R. rochai* presented 2n=28 chromosomes (Fig. 1c, e, g). In the male pachytene cells of both species, the chromosomal elements showed distinct and complex associations, making it difficult to accurately establish the total number of double filaments (Fig. 2e). The postpachytene nuclei of one male *R. agamemnon* from Teresina revealed 14 "bivalents" with the chromosomes disposed in parallel (Fig. 2f), whereas in the three male individuals from Mateiros, all chromosomes were involved in one complex multivalent association (CXXVIII) (Fig. 2g-h). The number of multivalent associations was extremely

variable among the cells of each individual, reflecting the dissociation of elements that constitute the chromosome chain. In the postpachytene cells of *R. rochai*, differences in the number of "bivalents" and chromosomes involved in multivalent associations were observed among the individuals examined, i.e., two males from Castelo do Piauí presented the meiotic formula 8II+CIV+CVIII (Fig. 2i), one male from Guanambi showed 10II+CVIII (Fig. 2j), and the other male from this latter locality exhibited 9II+CX (Fig. 2k). The metaphase II cells of *R. agamemnon* and *R. rochai* individuals exhibited the haploid number n=14 (Fig. 2I).

The analysis of spermatogonial and oogonial metaphase cells revealed a great diversity of the diploid number in *Tityus* species (Table 2): 2n=6 in *T. bahiensis* and *T. martinpaechi*; 2n=13 in *T. confluens*; 2n=14 in *T. fasciolatus*; 2n=16 in *T. costatus*, *T. paraguayensis*, and *T. stigmurus*; 2n=20 in *T. maranhensis* (Fig. 1i-x).

In *T. bahiensis*, a difference in the chromosome size was observed between the sexes. In males, among the five large-sized chromosomes, one element appeared slightly larger than the other chromosomes of the complement, whereas in females, all the chromosomes were large-sized (Fig. 1i). Furthermore, in *T. bahiensis*, *T. costatus*, and *T. stigmurus*, one subterminal constriction was also observed in one chromosome (Fig. 1q, u).

The early pachytene testicular cells of *T. bahiensis* (Fig. 3a), *T. martinpaechi* (Fig. 3c), *T. confluens* (Fig. 3e), *T. fasciolatus* (Fig. 3g), and *T. paraguayensis* (Fig. 3i) revealed unsynapsed interstitial and/or terminal chromosomal segments, which were generally continuous with completely paired regions. The total synapsis of the chromosomes was verified in late pachytene cells of these species, in which the following numbers of bivalent-like elements were identified: one or three in *T. bahiensis* (Fig. 3b), three in *T. martinpaechi* (Fig. 3d), seven in *T. confluens* (Fig. 3f) and *T. fasciolatus* (Fig. 3h), and eight in *T. paraguayensis* (Fig. 3j). In the pachytene nuclei of *T. fasciolatus* (Fig. 3h), and eight in *T. paraguayensis* (Fig. 3j). In the pachytene nuclei of *T. fasciolatus* (Fig. 3h), and eight in *T. paraguayensis* (Fig. 3j). In the pachytene nuclei of *T. fasciolatus* (Fig. 3h), and eight in *T. paraguayensis* (Fig. 3j).

*maranhensis*, only totally synapsed elements were observed (Fig. 3k-I); however, a variable number of completely synapsed structures was detected among the pachytene cells of a same individual, i.e., nine or 10 bivalent-like elements.

The early postpachytene spermatocytes of *T. bahiensis* and *T. martinpaechi* invariably showed a ring-like chromosome chain comprising six elements (CVI) (Fig. 4a, c). The dissociation between the elements that constitute the chromosome chain occurs in late postpachytene cells. Additionally, in this prophase I substage, the multivalent configuration usually appeared in a "zigzag" disposition (Fig. 4b, d). The postpachytene nuclei of all *T. confluens* individuals presented five bivalent-like elements and one multivalent association comprising three elements (5II+CIII) (Fig. 4e). In *T. fasciolatus*, seven bivalent-like elements with chromosomes in parallel alignment were observed. Furthermore, in this species, lightly stained, less-condensed chromatin was observed in the interstitial or terminal region of one or two "bivalents" (Fig. 4f).

Surprisingly, in *T. paraguayensis,* extremely different chromosomal configurations were verified in the postpachytene cells of a same individual. In two males, 100% of the examined nuclei presented eight "bivalents" with chromosomes aligned in parallel (Fig. 4g), whereas in one male, 40% of the cells revealed eight bivalent-like elements, and 60% showed five "bivalents" and three or four multivalent associations. These multivalent associations typically comprised four elements; however, in some cells, chromosome chains comprising up to eight chromosomes were visualised (Fig. 4h-i). The average diploid set length was 441 µm for cells with only bivalent-like elements and 827 µm for cells with "bivalents" and multivalent associations (CV=33.84).

Although *T. maranhensis* individuals presented the same diploid number, the postpachytene spermatocytes showed intra-individual variability, as different chromosomal constitutions were observed in the sample of males examined, which were categorised as: two males with 10 (53% of the cells) and nine (47% of the cells) bivalent-

like elements; one male with 10 (64.4% of the cells), nine (31%) "bivalents", and 8II+CIV (4.6% of the cells) (Fig. 4j-l). The average the diploid set lengths for nuclei with configurations of 10II, 9II, and 8II+CIV were 261  $\mu$ m, 256  $\mu$ m, and 208  $\mu$ m, respectively (CV=18.2).

Despite the occurrence of multivalent chromosome associations in the postpachytene cells of the *Tityus* species examined in this study, the haploid number and chromosomal size observed in metaphase II cells indicated that all chromosomes possessed a regular disjunction and balanced segregation. The metaphase II nuclei exhibited n=3 in *T. bahiensis* and *T. martinpaechi*, including three large or two large and one small chromosome (Fig. 5a-d); n=6 or n=7 in *T. confluens* (Fig. 5e-f); n=7 in *T. fasciolatus* (Fig. 5g); n=8 in *T. paraguayensis* (Fig. 5h); and n=10 in *T. maranhensis* (Fig. 5i).

# Silver nitrate impregnation

The mitotic metaphase cells of the 11 Buthidae species investigated in this study revealed two NORs localised on subterminal or terminal chromosome regions (Fig. 1). In *A. balzanii, T. bahiensis, T. martinpaechi,* and *T. paraguayensis,* the NORs were localised on large-sized chromosomes (Fig. 1b, j, l, t), whereas in *T. confluens, T. fasciolatus, T. costatus, T. stigmurus,* and *T. maranhensis,* the NORs were localised on medium/small-sized chromosomes (Fig. 1n, p, r, v, x). Moreover, one male *R. rochai* from Castelo do Piauí exhibited an additional NOR on the interstitial region of the largest chromosome of the complement (Fig. 1h).

# C-banding plus DAPI and DAPI/CMA<sub>3</sub> staining

Cytological preparations from the 11 buthid species were subjected to C-banding and subsequently stained with DAPI. The results (Fig. 6) enabled the classification of the

species into three groups according to the distribution of constitutive heterochromatic regions: 1) chromosomes without positive C-band regions, such as observed in *A. balzanii* and *R. rochai*; 2) chromosomes with small blocks of constitutive heterochromatin in the subterminal and terminal regions of some elements (Fig. 6a-e), such as those verified in *R. agamemnon* (subterminal and terminal regions of two bivalent-like elements), *T. bahiensis* (terminal region of two large-sized and one small-sized chromosome), *T. maranhensis*, *T. paraguayensis*, and *T. stigmurus* (terminal region of two elements); and 3) conspicuous C-banding in the terminal region of all chromosomes and interstitial regions of all or some elements (Fig. 6f-i), as observed in *T. confluens*, *T. costatus*, *T. fasciolatus*, and *T. martinpaechi*.

The chromosomal preparations of all species investigated in this work were subjected to DAPI/CMA<sub>3</sub> fluorochrome staining (Fig. 7). However, in these species, the number of blocks of constitutive heterochromatin exhibiting C-banding plus DAPI staining was larger than that revealed with DAPI/CMA<sub>3</sub> staining. In *R. agamemnon, T. bahiensis, T. confluens, T. fasciolatus, T. maranhensis, T. martinpaechi,* and *T. paraguayensis*, the terminal and interstitial positive C-band regions of some chromosomes were AT-rich (Fig. 7a-f). Additionally, in *R. rochai*, the terminal and subterminal regions of two chromosomes were positively stained with DAPI (Fig. 7g), and in *R. agamemnon* and *T. martinpaechi*, the terminal region of two chromosomes revealed bright CMA<sub>3</sub> labelling (Fig. 7h-i). When the mitotic and meiotic cells of *A. balzanii, T. costatus*, and *T. stigmurus* were stained with DAPI/CMA<sub>3</sub>, the chromosomes appeared homogeneously stained with no bright region.

osome	lities in	igh the	of four	
chrom	ion loca	ed throu	chain .	somes.
and the	Collect	stablishe	s, CIV=	chromo
e size,	ntheses.	mber e	nosome	ain of 28
mosom	in pareı	ploid nu	e chror	VIII=cha
er, chro	shown	tins. <sup>a</sup> di	of thre	es, CXX
d numb	ration is	)=Tocan	l=chain	mosom
e diploid	configu	aulo, TO	nt", CII	10 chro
iding the	ith each	=São Pa	l="bivale	chain of
dy, inclu	e cells w	aná, SP:	size. II	es, CX=
this stud	achytene	PR=Para	S=small	mosomo
'sed in	of postp	=Piauí, I	size,	ight chre
vs analy	number (	erais, Pl⊧	medium	hain of e
scorpior	s. The r	linas Ge	ize, M=	CVIII=cl
uthidae	the male	, MG=M	-large s	somes,
es of Br	cells of	E=Ceará	ales. L=	( chromo
e feature	chytene	ahia, CE	of fem	ain of siy
mosom€	postpac	S: BA=B	analysis	CVI=ch;
2. Chro	ration in	n states	some a	somes,
Table	configu	Brazilia	chroma	chroma

species	Dipiola number and	Postpachytene configuration	Collection localities
	chromosome size		
Ananteris balzanii	14=4L+10M/S	1♂ - 5II+CIV (13)	Guanambi, BA
		1 <i>3</i> - 711 (3)	Guanambi, BA
		13	Rio Claro, SP
Rhopalurus agamemnon	28=28M/S	3♂ - CXXVIII (45)	Mateiros, TO
		1 <i>3</i> - 14II (12)	Teresina, PI
Rhopalurus rochai	28=28M/S	2♂ - 8II+CIV+CVIII (27)	Castelo do Piauí, PI
		1♂ - 9II+CX (18)	Guanambi, BA
		1♂ - 10II+CVIII (12)	Guanambi, BA
Tityus (Archaeotityus)			
Tityus maranhensis	20=4L+16M/S	2♂ - 10II (44); 9II (39)	Floresta Nacional de Palmares, Altos, PI
		1 3 - 1011 (56); 911 (27); 811+CIV (4)	Floresta Nacional de Palmares, Altos, Pl
		2ð	Floresta Nacional de Palmares, Altos, Pl
Tityus paraguayensis	16=8L+8M/S	2♂ - 8II (20)	Ilha São Francisco, Guairá, PR
		1 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 - 11 -	Ilha São Francisco, Guairá, PR
		13	Ilha São Francisco, Guairá, PR
Tityus (Tityus)			
Tityus bahiensis	6=5L+1S	7♂ - CVI (100)	Ilha Grande, Guairá, PR
Tityus confluens	13=1L+12M/S	2♂ - 5II+CIII (93)	Guadalupe, PI
Tityus costatus	<sup>a</sup> 16=4L+12M/S		Palmeira, PR
Tityus fasciolatus	14=6L+8M/S	10 <i>3</i> - 7II (17)	Ituiutaba, MG
Tityus martinpaechi	6=5L+1S	2ð - CVI (80)	Parque Nacional de Ubajara, Ubajara, CE
Tityus stigmurus	<sup>a</sup> 16=4L+12M/S		Floresta Nacional do Araripe, Barbalha, CE



**Fig. 1** Mitotic metaphase cells of Buthidae scorpions after standard staining (**a**, **c**, **e**, **g**, **i**, **k**, **m**, **o**, **q**, **s**, **u**, and **w**) and silver impregnation (**b**, **d**, **f**, **h**, **j**, **l**, **n**, **p**, **r**, **t**, **v**, and **x**). **a-b** Ananteris balzanii,  $2n \triangleleft = 14$ . **c-d** Rhopalurus agamemnon,  $2n \triangleleft = 28$ . **e-h** Rhopalurus rochai,  $2n \triangleleft = 28$ . **i-j** Tityus bahiensis,  $2n \triangleleft = 6$ . **k**-I Tityus martinpaechi,  $2n \triangleleft = 6$ . **m-n** Tityus confluens,  $2n \triangleleft = 13$ . **o-p** Tityus fasciolatus,  $2n \triangleleft = 14$ . **q-r** Tityus costatus,  $2n \triangleleft = 16$ . **s-t** Tityus paraguayensis,  $2n \triangleleft = 16$ . **u-v** Tityus stigmurus,  $2n \triangleleft = 16$ . **w-x** Tityus maranhensis,  $2n \triangleleft = 20$ . In all the species, the nucleolar organiser regions (NORs; arrows) were localised to the subterminal or terminal regions of two chromosomes. Note that an additional NOR in an interstitial region is present in one of the chromosomes of *R. rochai* (**h**). Arrowhead=constriction. Scale bar=10 µm.



**Fig. 2** Testicular cells of Buthidae scorpions stained with Giemsa. **a**-**d** Ananteris balzanii. **e**, **i**-**k** Rhopalurus rochai. **f**-**h**, **I** Rhopalurus agamemnon. **a** Pachytene cell with seven "bivalents". **b** Postpachytene cell with seven "bivalents", denoting chromosomes in parallel disposition. **c** Postpachytene cell showing five "bivalents" plus one chromosome chain (C) comprising four elements (5II+CIV). **d** Metaphase II cell with n=7 chromosomes. **e** Pachytene cell with 14 "bivalents". **g**-**h** Postpachytene cells showing the complex multivalent association of almost all chromosomes of the complement. **i** Postpachytene cell with eight "bivalents" plus one chromosome chain of four chromosome chain of eight chromosomes (8II+CIV+CVIII). The detail highlights the chromosome chain comprising eight elements. **j** Postpachytene cell with 10 "bivalents" plus one chain of 10 chromosomes (9II+CX). **I** Metaphase II cell with n=14 chromosomes. Scale bar=10 µm.



**Fig. 3** Pachytene testicular cells of *Tityus* species stained with Giemsa. **a-b** *Tityus* bahiensis. **c-d** *Tityus* martinpaechi. **e-f** *Tityus* confluens. **g-h** *Tityus* fasciolatus. **i-j** *Tityus* paraguayensis. **k-l** *Tityus* maranhensis. The arrows in **a**, **c**, **e**, **g**, and **i** indicate unsynapsed chromosome segments. Scale bar=10 μm.



**Fig. 4** Postpachytene cells of *Tityus* species stained with Giemsa. **a-b** *Tityus bahiensis* with one chromosome chain (C) of six chromosomes (CVI). Note the "zig-zag" disposition of the multivalent association (**b**). **c-d** *Tityus martinpaechi* with a multivalent association involving all chromosomes of the complement (CVI). Note the early segregation of some elements that constituted the multivalent association (**d**). **e** *Tityus confluens* with five "bivalents" plus one chromosome chain of three chromosomes (5II+CIII). **f** *Tityus fasciolatus* with seven "bivalents", exhibiting chromosomes in parallel alignment. The arrow indicates the gap region in one "bivalent". **g-i** *Tityus paraguayensis* with eight "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV) (**h**), and five "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV) (**h**), and five "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV) (**h**), and five "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV) (**h**), and five "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV) (**h**), and five "bivalents" plus three chains of four chromosomes (5II+3CIV+CVIII) (**i**). **j-I** *Tityus maranhensis*, with 10 "bivalents" (**j**), nine "bivalents" (**k**), and eight "bivalents" plus one chain composed of four chromosomes (8II+CIV) (**l**). Scale bar=10 µm.



**Fig. 5** Metaphase II spermatocytes of *Tityus* species stained with Giemsa. **a-b** *Tityus bahiensis*. **c-d** *Tityus martinpaechi*. These cells exhibit n=3, including three large (**a**, **c**) or two large and one small (**b**, **d**) chromosomes. **e-f** *Tityus confluens* with n=6 and n=7, respectively. **g** *Tityus fasciolatus* with n=7 chromosomes. **h** *Tityus paraguayensis* with n=8 chromosomes. **i** *Tityus maranhensis* with n=10 chromosomes. Scale bar=10  $\mu$ m.



**Fig. 6** Patterns of C-banding plus DAPI staining in the chromosomes of Buthidae species. Postpachytene cell of *Rhopalurus agamemnon* (**a**). Mitotic metaphase cells of *Tityus bahiensis* (**b**), *Tityus maranhensis* (**c**), *Tityus paraguayensis* (**d**), *Tityus stigmurus* (**e**), *Tityus confluens* (**f**), *Tityus costatus* (**g**), *Tityus fasciolatus* (**h**), and *Tityus martinpaechi* (**i**). Note the blocks of constitutive heterochromatin in terminal (arrows) or interstitial (arrowheads) chromosome regions. Scale bar=10 µm.



**Fig. 7** Mitotic metaphase cells of Buthidae scorpions stained with DAPI and CMA<sub>3</sub>. **a** *Rhopalurus agamemnon*. **b** *Tityus bahiensis*. **c** *Tityus confluens*. **d** *Tityus fasciolatus*. **e** *Tityus martinpaechi*. **f** *Tityus paraguayensis*. **g** *Rhopalurus rochai*. **h** *Rhopalurus agamemnon*. **i** *Tityus martinpaechi*. The cells shown in **a-g** reveal chromosomes with AT-rich chromatin in terminal (large arrow) and interstitial (arrowhead) regions and the nuclei shown in **h** and **i** exhibit chromosomes with GC-rich chromatin regions (small arrow). Scale bar=10 µm.

## DISCUSSION

Among the 11 buthid species examined in this study, only the *Rhopalurus* species showed conserved diploid numbers, with individuals from the four sampled localities exhibiting 2n=28. Notably, Piza (1957) reported this chromosome number for one *R. rochai* male from state of Alagoas, Brazil. In Buthidae, only two other genera, *Androctonus* and *Centruroides*, with five and two species analysed, respectively, have shown interspecifically conserved diploid numbers (Wilson 1931; Riess et al. 1978; Moustafa et al. 2005).

Although the mitotic cells of the two *Rhopalurus* species showed consistent chromosome numbers, the prophase I cells of all males revealed variability in the presence or absence of chromosome chains and number of chromosomes in complex meiotic configurations (Table 2). In *R. rochai*, a clear inter- and intra-populational diversity in the number of chromosomes that constituted the chromosome chains was verified in the sample analysed by us (Table 2) and those investigated by Piza (1957) (11II+CVI). These results indicate that heterozygous reciprocal translocations are responsible for the chromosome variability in these species.

In contrast, the intraspecific variation observed in *A. balzanii* and *T. bahiensis* was not only related to multivalent associations during meiosis but also with the diploid number and/or chromosome size. The 2n=14 herein established for all individuals of *A. balzanii*, differed from the data of Piza (1947) for one female from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, which showed 2n=12. *Tityus bahiensis* has been identified as the buthid species with the highest karyotype diversity, including 10 distinct diploid numbers (see Schneider et al. 2012). The chromosome set with 2n=6 observed in the population of *T. bahiensis* studied in this work was most frequently reported for this species and has been described for seven other Brazilian populations (Piza 1939a, b; Piza 1940; Brieger and Graner 1943; Piza 1943a; b; Schneider et al. 2009b). The interpopulational variation in diploid number in these two Buthidae species and the presence of an intrapopulational difference of the chromosome size in *T. bahiensis* reflects fission and/or fusion rearrangements. Additionally, one male *A. balzanii* from Guanambi and all males *T. bahiensis* from a single locality exhibited multivalent chromosome associations during meiosis I, suggesting that fission and/or fusion also occurs in a heterozygous state within populations.

With the exception of *T. costatus* and *T. stigmurus*, in which the cytogenetic analyses were only accomplished in female individuals, in all species of the genera *Ananteris*, *Rhopalurus*, and *Tityus*, unsynapsed chromosome segments were observed in pachytene spermatocytes. The unsynapsed regions were generally interstitial and continuous with synapsed chromosome segments. The lack of synapsis is typically associated with the absence of chromosomal homology, and it has been verified in several organisms that carry heterozygous chromosome rearrangements (Ziclker and Kleckner 1999). However, in buthids, the presence of long, well-paired meiotic elements resembling bivalents revealed that nonhomologous chromosome regions are heterosynapsed during the late pachytene stage. Thus, many of the double filaments observed in prophase I cells did not have homology along their total length and should be considered bivalent-like elements.

The individual carriers of the rearrangements in a heterozygous state exhibited multivalent chromosome associations in the postpachytene nuclei. In the species investigated herein, the absence of complex multivalent associations was only observed in *T. fasciolatus*. Otherwise, the occurrence of unsynapsed chromosome segments in early pachytene cells and bivalent-like elements with distinctly associated regions (gaps and less-condensed chromatin) in postpachytene nuclei indicates that certain chromosome regions of *T. fasciolatus* were also nonhomologous. However, these

regions were most likely smaller than those in other *Tityus* species, resulting in the lack of multivalent association during meiosis I.

In *T. maranhensis*, the presence of different chromosome associations in cells of the same individual (Table 2) were originated from a variable degree of heterosynapsis between nonhomologous chromosome regions. This idea has been supported by the DSL values obtained, whose differences were not significant statistically (CV=18.2) when postpachytene nuclei with variable numbers of "bivalents" and/or chromosome associations were compared. Thus, when the nonhomologous chromosome segments were synapsed, the postpachytene cells showed elements resembling bivalents; on the other hand, when nonhomologous chromosome regions. Similar to the observations in buthids, various degrees of heterosynapsis have also been described in other organisms, which were heterozygous for paracentric or pericentric inversions (Reed et al. 1992; Díez and Santos 1993).

A fascinating intra-individual variability of chromosome associations was encountered in the postpachytene cells of *T. paraguayensis* (Table 2). It is worth pointing out that eight bivalent-like elements were expected in these cells once the mitotic spermatocytes showed 2n=16. Initially, we ascribed the increased number of elements, which were associated in "bivalents" and chromosome chains, to chromosome fissions; the chromosome fragments derived from this rearrangement might segregate normally due to the holocentric nature of the chromosomes (Melters et al. 2012). Nevertheless, this prediction was ruled out because the DSL values, which showed statistically significant differences (CV=33.84) between the cells with "bivalents" and cells with "bivalents" plus multiple chromosome associations (Table 2). Alternatively, we attributed this result to the occurrence of endopolyploidy. As a consequence of this event, tetraploid cells could be generated, facilitating the appearance of homologous chromosome segments synapsed in different ways; thus, complex multivalent associations were observed in postpachytene cells. Considering the absence of polyploidy in the sample of metaphase II nuclei analysed, it is reasonable to conclude that the "aberrant cells" were degenerated during the cellular cycle, reflecting errors in chromosome segregation. However, if these polyploidy cells were fertile gametes, then embryos with an extra haploid set might be generated. Thus, an effort to identify this intriguing cell type in different stages of meiosis and in a wide diversity of scorpions should be undertaken considering that these cells might have evolutionary implications for the origin of parthenogenetic species and the speciation of certain species. Notably, among the 11 scorpions described as having a parthenogenetic mode of reproduction (Toscano-Gadea 2004; Yamazaki and Makioka 2004; Lourenço 2008), six species belong to the genus *Tityus*. Additionally, the transition from diploidy to polyploidy is a relatively common event in plants and some animal taxa and represents a rapid speciation process because the hybrid individuals rarely form genetically balanced gametes (Mable 2004).

Among the scorpions sampled herein, the heterozygous chromosome rearrangements reached the highest level in *R. agamemnon*, *T. bahiensis*, and *T. martinpaechi*, considering that all elements of the diploid set were involved in multivalent associations. In the majority of the organisms, chromosomal chains comprising more than four elements are rare (Gruetzner et al. 2006); however, these chains have occasionally been identified in some species of plants and animals (for example, see Sharp and Rowell 2007; Da Silva et al. 2008; Gross et al. 2009; Šťáhlavský et al. 2012). In *A. balzanii, R. rochai*, and *T. maranhensis*, the presence of polymorphic meiotic configurations among individuals sharing the same locality may be attributed to two factors: 1) the heterozygous rearrangements were not fixed within the populations; 2) the sampled populations occur in a hybrid zone, in which individual carriers of distinct

chromosome rearrangements overlap. Nevertheless, an effort to obtain detailed knowledge regarding the spatial distribution and population biology of the Neotropical buthids should be undertaken, as this information could help to understand the responsible factors to the maintenance of heterozygous chromosome rearrangements in this group.

Based on the orientation of the chromosomes during late meiosis I and the haploid set observed in metaphase II, the chromosomes of the species analysed in the present work undergo balanced segregation. This type of segregation permits the maintenance of fertility in individual carriers of long chromosome chains (Sharp and Rowell 2007). The change of position and frequency of chiasma affects the orientation and, consequently, the segregation of heterozygous rearranged chromosomes (Rickards 1983). In Scorpiones, the combination of both a high frequency of heterozygous chromosome rearrangements and crossing-over may lead to the formation of unbalanced gametes, drastically reducing the fertility of the individuals. Therefore, the occurrence of an achiasmate mode of meiosis could represent a selective advantage for all species of this order. Furthermore, scorpions likely constitute an uncommon group in which the achiasmate meiosis is not restricted to the heterogametic sex, as verified in many other organisms (Procunier 1975; Serrano 1981; Traut and Clarke 1996; Rodríguez-Gil et al. 2002; Šťáhlavský and Král 2004), but it may occur in both male and female individuals.

In Scorpiones, few studies to identify specific chromosomes regions have been conducted (Shanahan 1989a, b; Schneider et al. 2009a, b). The employment of the silver impregnation technique in 11 Buthidae species facilitated the verification that the number and location of NORs remained practically unchanged despite extensive chromosome variation. Additionally, our data revealed that two NORs located on terminal or subterminal regions seem to be a shared characteristic among species belonging to the genera *Ananteris*, *Rhopalurus*, and *Tityus*. The change in the number and location of NORs observed in one specimen of *R. rochai* can be attributed to chromosomal translocation. This mechanism has been responsible for the repatterning of NORs in many animal species, including those with conserved karyotype characteristics (Zhang and Sang 1999; Cabrero and Camacho 2008; Dutrillaux and Dutrillaux 2012).

The use of the C-banding and fluorochrome staining techniques revealed different patterns of constitutive heterochromatin distribution and AT- or GC-rich regions in the chromosomes of buthids. In general, the species with conspicuous blocks of heterochromatin seem to have the lowest rates of chromosomal rearrangement, e.g., *T. confluens* and *T. fasciolatus*. The reduction of quantity of heterochromatin in certain Buthidae species could be facilitated through other rearrangements, such as small deletions, that occurred together with chromosome translocations or fusions/fissions. However, due to the structural and functional role of heterochromatic regions (Sumner 2003) and the fact that some NORs were coincident with positive C-band regions in buthids, the heterochromatin may preserve chromosome integrity and prevent breakage at specific chromosome sites.

In conclusion, our investigation of the chromosomes of Buthidae species has provided insight into the chromosomal rearrangements responsible for the extensive diversity of diploid number and/or complex configuration observed during meiosis. Furthermore, we showed that individual carriers of the same diploid number differ in their structural chromosome organisation, as different chromosome associations in meiotic cells were observed within some species. Therefore, the analysis of both mitotic and meiotic cells is undoubtedly indispensable for the evaluation of chromosome diversity and the identification of the mechanisms responsible for chromosome variability in scorpions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Ricardo Pinto-da-Rocha and MSc Sabrina Outeda-Jorge from the Universidade de São Paulo, Dr Douglas Araujo from the Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, and Centro de Controle de Zoonoses from Ituiutaba, state of Minas Gerais, Brazil, for collecting some of the Buthidae specimens. This research was supported through funding from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2010/14226-2, 2011/21643-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (478630/2010-7). This work was also part of the "Programa de Pesquisas em Biodiversidade do Semiárido – PPBio Semiárido" (CNPq 558317/2009-0). Collecting permits were granted by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA and the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (25471-1; 25472-1; 15157-1).

## REFERENCES

Bertani R, Martins R, Carvalho MA (2005) Notes on *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones: Buthidae) in Brazil. Zootaxa 869: 1-7.

Brieger FG, Graner EA (1943) On the cytology of *Tityus bahiensis* with special reference to meiotic prophase. Genetics 28: 269-274.

Cabrero J, Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Res 16: 595-607.

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

Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela AAL (2008) Chromosome reduction in *Eleocaris maculosa* (Cyperacea). Cytogenet Genome Res 122: 175-180.

Díez M, Santos JL (1993) Synapsis in a paracentric inversion heterozygote of *Chrothippus jacobsi* (grasshopper). Heredity 70: 231-236.

Dutrillaux AM, Dutrillaux B (2012) Chromosome analysis of 82 species of Scarabaeoidea (Coleoptera), with special focus on NOR localization. Cytogenet Genome Res 136: 208-219.

Gomes FP (1982) Curso de estatística experimental, 10th edn. Nobel.

Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C (2009) Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Shymphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chains observed in vertebrates. Heredity 102: 435-444.

Gruetzner F, Ashley T, Rowell DM (2006) How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. Chromosoma 115: 75-88.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.

John B (1990) Meiosis. Melbourn: Cambridge University Press, Melbourn.

Lenarducci ARIP, Pinto-da-Rocha R, Lucas SM (2005) Descrição de uma nova espécie de *Rhopalurus* Throrell, 1876 (Scorpiones: Buthidae) do nordeste brasileiro. Biota Neotrop 5: 1-8.

Lourenço WR (2002) Scorpions of Brazil. Museum National d' Histoire Naturelle, Paris.

Lourenço WR (2006) Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). Boletín de la S E A 39: 55-67.

Lourenço WR (2008) Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. J. Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 14: 19-44.

Lourenço WR, Aparecida-da-Silva E (2007) New evidence for a disrupted distribution pattern of the *"Tityus confluens"* complex, with a description of a new species from the State of Pará, Brazil (Scorpiones, Buthidae). Amazoniana 19: 77-86.

Lourenço WR, Cabral BC, Ramos ECB (2004) Confirmation of *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones, Buthidae) in Brazil and description of a new subspecies from the State of Mato Grosso do Sul. Boletín de la S E A 34: 27-30.

Lourenço WR, Jesus-Junior MMBG, Limeira-de-Oliveira F (2006) A new species of *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) from the State of Maranhão in Brazil. Boletín de la S E A 38: 117-120.

Mable BK (2004) 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. Biol J Linn Soc 82: 453-466.

Makino S (1956) A review of the chromosome numbers in animals. Tokyo: Hokurykan.

Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In: Goldsmith MR, Marec F, eds. Molecular biology and genetics of Lepidoptera. CRS press pp. 49-63.

Melters DP, Paliulus SV, Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Res 5: 579-593.

Moustafa MA, Alaa AM, Sarhan MH, Yassen AE (2005) Chromosomal studies on four Egyptian scorpion species of genus *Androctonus* (Family: Buthidae). Cytologia 70: 161-165.

Piza ST (1939a) Comportamento dos cromossomos na primeira divisão do espermatócito do *Tityus bahiensis*. Sci Genet 1: 255-261.

Piza ST (1939b) Considerações em torno da meiose do *Tityus bahiensis* (Scorpiones-Buthidae) e uma nova teoria sobre a movimentação dos cromossomos. J Agron 2: 343-370.

Piza ST (1940) Poliploidia natural em *Tityus bahiensis* (Scorpiones) associada a aberrações cromossômicas espontâneas. Rev Biol e Hyg 10: 143-155.

Piza ST (1943a) Meiosis in the male of Brazilian scorpion *Tityus bahiensis*. Rev Agric 18: 249-276.

Piza ST (1943b) A propósito da meiose de Tityus bahiensis. Rev. Agric 18: 351-369.

Piza ST (1947) Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. An Esc Super Agric Luiz de Queiroz 62: 169-176.

Piza ST (1957) The chromosomes of *Rhopalurus* (Scorpiones-Buthidae). Can Entomol 89: 565-568.

Prendini L, Wheeler WC (2005) Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic, anarchy, and standards for peer review in online publishing. Cladistics 21: 446-494.

Procunier WS (1975) A cytological study of two closely related blackfly species: *Cnephia dacotensis* and *Cnephia ornithophilia* (Diptera: Simulidae). Can J of Zool 53: 1622–1637.

Reed KM, Sites JWJr, Greenbaum IF (1992) Synapsis, recombination, and meiotic segregation in the mesquite lizard, *Sceloporus grammicusi*, complex. I. Pericentric inversion heteromorphism of the F5 cytotype. Cytogenet Cell Genet 61: 40-45.

Rein JO (2012) The Scorpion Files. Retrieved from http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/ 14/9/2012.

Rickards GK (1983) Orientation behaviour of chromosome multiples of interchange (reciprocal translocation) heterozygotes. Ann Rev Genet 17: 443-498.

Riess RW, Barker KR, Biesele JJ (1978) Nuclear and chromosomal changes during sperm formation in the scorpion, *Centruroides vittatus* (Say). Caryologia 31: 147-160.

Rodríguez-Gil SG, Mola LM, Papeshi AG, Scioscia CL (2002) Cytogenetic heterogeneity in common haplogynae spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). J Arachnol 30: 47-56.

Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2012) The scorpion cytogenetic database. Retrieved from www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase 14/9/2012.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009a) A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. J Hered 5: 545-555.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009b) Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. Chromosome Res 17: 883-898.

Serrano J (1981) Male achiasmatic meiosis in Caraboidea (Coleoptera, Adephaga). Genetica 57: 131-137.

Shanahan CM (1989a) Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. Genome 32: 882-889.

Shanahan CM (1989b) Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). Genome 32: 890-900.

Sharp HE, Rowell DM (2007) Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in a Australian spider. J Ev Biol 20: 2427-2439.

Soleglad ME, Fet V (2003) High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). Euscorpius 11: 1-175.

Souza CAR, Candido DM, Lourenço WR (2006) Description of the male of *Tityus martinpaechi* Lourenço, 2001 (Scorpiones, Buthidae). Zootaxa 1260: 27-35.

Souza CAR, Candido DM, Lucas SM, Brescovit AD (2009) On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). Zootaxa 1987: 1-38.

Šťáhlavský F, Král J (2004) Karyotypes analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). Hereditas 140: 49-60.

Šťáhlavský F, Král J, Haddad CR (2012) The first cytogenetic characterization of atemnids: Pseudoscorpions with the highest chromosome numbers (Arachnida: Pseudoscorpiones). Cytogenet Genome Res 137: 22-30.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75: 304-306.

Sumner AT (2003) Chromosome organization and function. North Berwick (UK): Blackwell Publishing.

Toscano-Gadea CA (2004) Confirmation on parthenogenesis in *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae). J Arachnol 32: 866-869.

Traut W, Clarcke CA (1996) Cytogenetics of a moth species with a low chromosome number, *Orgyia thyellina*. Hereditas 125: 277-283.

Wilson EB (1931) The distribution of sperm-forming materials in scorpions. J Morphol and Physiol 52: 429-483.

Yamazaki K, Makioka T (2004) Parthenogenesis through five generations in the scorpion *Liocheles australasiae* (Fabricius 1775) (Scorpiones, Ischnuridae). J. Arachnol 32: 852-856. Zhang D, Sang T (1999) Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. Am J Bot 86: 735-740.

Zickler D, Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Ann Rev Genet 33: 603-754.


1. Tityus confluens (Foto: L. S. Carvalho)
2. Tityus costatus (Foto: T. J. Porto)
3. Tityus fasciolatus (Foto: A. Tietz)
4. Tityus maranhensis (Foto: L. S. Carvalho)



Localização dos genes de rDNA 45S em cromossomos mitóticos e meióticos de escorpiões da família Buthidae

Viviane Fagundes Mattos<sup>1\*</sup>, Doralice Maria Cella<sup>1</sup>, Leonardo Sousa Carvalho<sup>2</sup> and Marielle Cristina Schneider<sup>3</sup>\*

1. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Avenida 24-A, 1515, Caixa Postal 199, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

2. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Campus Amílcar Ferreira Sobral, BR 343, km 3.5, 64800-000, Floriano, Piauí, Brasil.

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Ciências Biológicas,
Av. Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270, Diadema, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding authors. Tel.: +551935264140; Fax: +551935264136 E-mail: vivianefagundesmn@hotmail.com; marielle.unifesp@gmail.com

#### RESUMO

Os escorpiões Buthidae apresentam uma grande variabilidade no número diploide, a qual ocorre tanto entre espécies do mesmo gênero quanto entre indivíduos da mesma espécie. Buthidae se diferencia das demais famílias pelo fato de exibir os menores números diploides, que variam de 2n=5 a 2n=56, cromossomos holocêntricos, e cadeias cromossômicas complexas durante a meiose. Neste estudo, analisamos a distribuição dos genes de rDNA 45S, em cromossomos mitóticos e meióticos de sete espécies de Buthidae, pertencentes a dois gêneros (Rhopalurus e Tityus), visando obter conhecimento sobre a organização e evolução cromossômica destes escorpiões. O número cromossômico variou de 2n=6 a 2n=28, no entanto, em todas as espécies, os sítios de rDNA 45S estão invariavelmente localizados na região terminal de dois cromossomos. Análises de células meióticas revelaram clusters de rDNA 45S nas cadeias cromossômicas de Rhopalurus agamemnon, Tityus bahiensis, Tityus confluens e Tityus martinpaechi, ou em elementos totalmente sinapsados semelhantes a bivalentes em Rhopalurus rochai, T. bahiensis, T. confluens, Tityus fasciolatus e Tityus paraguayensis. Adicionalmente, os sítios de rDNA 45S foram coincidentes com as regiões de heterocromatina constitutiva. Em T. bahiensis, variações quanto à localização dos sítios ribossomais, provavelmente foram originadas através de rearranjos cromossômicos do tipo fissão/fusão. Em T. confluens, apesar de todos os indivíduos apresentarem mesmo número diploide e configuração meiótica, a variação quanto a localização do rDNA 45S indica que os rearranjos cromossômicos não envolveram os mesmos elementos cromossômicos. Região de heterocromatina constitutiva associada a sítios ribossomais facilita a ocorrência de rearranjos estruturais e levam a uma variação no número de cópias e localização das regiões de rDNA. Entretanto, os rearranjos cromossômicos em Buthidae parecem não envolver os sítios de rDNA, e a

heterocromatina pode desempenhar outro papel neste grupo, possivelmente mantendo a integridade destes genes.

Palavras-chave: Cadeia cromossômica; Cístron ribossomal; Cromossomos holocêntricos; FISH; Heterocromatina; Número diploide

# ABREVIAÇÕES

FISH: Hibridação *in situ* fluorescente FITC: Fluoresceína-isotiocianato DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol RONs: Regiões organizadoras de nucléolo rDNA: DNA ribosomal

## INTRODUÇÃO

Os escorpiões são citogeneticamente caracterizados como um grupo que apresenta uma grande variabilidade no número cromossômico, a qual ocorre tanto entre espécies do mesmo gênero, e.g. Tityus com 2n=5 a 2n=27 (Schneider et al. 2012), quanto entre indivíduos de uma mesma espécie, e.g. Urodacus novahollandiae (Peters 1861) com 2n=66-175 (Shanahan 1989a). Adicionalmente, a ausência de recombinação genética através do crossing-over, que provavelmente ocorre durante a meiose de machos e fêmeas, é outra característica comum a todas as espécies já investigadas (Schneider et al. 2009a, b). Entre as nove famílias que possuem alguma informação citogenética, Chactidae, Euscorpiidae, Iuridae e Vaejovidae tiveram apenas uma espécie analisada; entre as outras cinco famílias, Bothriuridae, Liochelidae, Buthidae, Scorpionidae, e Urodacidae, as três últimas são aquelas que apresentaram as maiores variabilidades inter e intraespecíficas de número diploide (Schneider et al. 2012). No entanto, Buthidae diferencia-se das demais famílias pelo fato de exibir: 1) os menores números diploides, que variam de 2n=5 a 2n=56 (Schneider et al. 2012); 2) cromossomos holocêntricos, os quais são caracterizados pela ausência de um centrômero localizado (Guerra et al. 2010); 3) cadeias cromossômicas complexas durante a meiose, as quais podem envolver todos os elementos do complemento e são originadas por rearranjos dos tipos translocações recíprocas ou fissões/fusões cromossômicas (Mattos et al. 2013).

A ocorrência desta grande diversidade de número diploide, bem como de cromossomos holocêntricos, dificulta a comparação cariotípica entre as espécies de Buthidae, uma vez que não há características como, morfologia cromossômica e localização precisa de regiões cromossômicas específicas, que permitam identificar os elementos. Além disso, a maioria dos estudos citogenéticos em Buthidae foram realizados com o emprego de técnicas de coloração convencional dos cromossomos (Piza 1947, 1950, 1952, 1957; Sharma et al. 1959; Newlands e Martindale 1980;

Moustafa et al. 2005). Apenas 18 e 13 espécies de escorpiões butídeos foram analisadas quanto à distribuição de regiões heterocromáticas constitutivas e regiões organizadoras de nucléolo (RONs), respectivamente (Shanahan 1989b; Schneider et al. 2009a, b; Schneider e Cella 2010; Mattos et al. 2013).

As RONs são marcadores cromossômicos úteis para identificar os cromossomos, para estudos de sistemática e filogenia, bem como de evolução cariotípica, uma vez que podem representar sinapomorfias para determinados grupos e fornecer dados sobre os mecanismos responsáveis pelas variações cromossômicas inter e/ou intraespecíficas (Zhang e Sang 1999; Datson e Murray 2006; Pisano e Ghigliotti 2009; Cabral-de-Mello et al. 2011). Apesar da impregnação pelo íon prata ser a técnica mais amplamente utilizada para localizar as RONs, devido a sua fácil aplicabilidade e baixo custo, esta metodologia evidencia apenas as RONs que foram ativas transcricionalmente durante a interfase (Goodpasture e Bloom 1975; Howell e Black 1980; Verma e Babu 1995). Adicionalmente, nos escorpiões, a visualização das RONs através da impregnação pelo íon prata, só é possível em alguns estágios específicos da divisão celular, como paquíteno e metáfase mitótica. Desta forma, o emprego da técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH) com sonda de rDNA pode ser bastante útil para localizar todos os cístrons ribossomais nos cromossomos de escorpiões Buthidae, especialmente nos elementos envolvidos nas cadeias cromossômicas observadas durante a meiose. Neste estudo, nós investigamos a distribuição dos genes de rDNA 45S em sete espécies de Buthidae, visando obter um conhecimento detalhado sobre a organização e evolução cromossômica destes escorpiões que possuem uma grande variabilidade no número diploide.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

As espécies analisadas neste trabalho e seus respectivos locais de coleta no Brasil foram: *Rhopalurus agamemnon* (C. L. Koch, 1839), Mateiros (10°33'S, 46°27'W), Tocantins; *Rhopalurus rochai* Borelli, 1910, Guanambi (14°18'S, 42°44'W), Bahia; *Tityus bahiensis* (Perty, 1833), Ilha Grande (24°01'S, 54°10'W), Parque Nacional de Ilha Grande, Guaíra, Paraná e Estação Ecológica de Santa Bárbara (24°48'S, 49°13'W), Águas de Santa Bárbara, São Paulo; *Tityus confluens* Borelli, 1899, Guadalupe (06°51'S, 43°27'W), Piauí; *Tityus fasciolatus* Pessôa, 1935, Ituiutaba (18°58'S, 49°28'W), Minas Gerais; *Tityus martinpaechi* Lourenço, 2001, Serra da Ibiapaba (03°49'S, 40°59'W), Ubajara, Ceará; *Tityus paraguayensis* Kraepelin, 1895, Ilha São Francisco (18°58'S, 49°28'W), Parque Nacional de Ilha Grande, Guaíra, Paraná. Os exemplares coletados foram depositados no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil (IBSP, curadora D. M. Barros Battesti) e Coleção de História Natural, Universidade Federal do Piauí, Floriano, PI, Brasil (CHNUFPI, curador L. S. Carvalho).

As preparações cromossômicas foram obtidas de indivíduos machos, seguindo a metodologia descrita por Schneider et al. (2009b). Para a localização dos sítios de rDNA 45S, as preparações citológicas foram submetidas à técnica de FISH, utilizando a sonda pDm238. As sondas foram marcadas com digoxigenina por Nick Translation e detectadas com rodamina conjugada à anti-digoxigenina. A hibridização foi realizada de acordo com a metodologia de Pinkel et al. (1986), com modificações sugeridas por Silva et al. (2012). Alternativamente, as sondas foram marcadas com biotina por Nick Translation, detectadas com avidina conjugada a fluoresceína-isotiocianato (FITC), e a hibridização foi realizada conforme Cabral-de-Mello et al. (2010). Os cromossomos foram contracorados com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As imagens foram capturadas, através do software DP Controller, usando uma câmera digital Olympus

DP71 acoplada ao microscópio Olympus BX51. As imagens foram sobrepostas utilizando o software DP Manager.

#### RESULTADOS

A análise de metáfases espermatogoniais das sete espécies de Buthidae mostrou a presença de cromossomos holocêntricos e uma variabilidade interespecífica no número diploide: 2n=28 em *R. agamemnon* e *R. rochai*; 2n=6 nos exemplares de *T. bahiensis* das duas localidades estudadas e *T. martinpaechi*; 2n=13 em *T. confluens*; 2n=14 em *T. fasciolatus*; 2n=16 em *T. paraguayensis*. No entanto, em todas estas espécies, os sítios de rDNA 45S estão invariavelmente localizados na região terminal de dois cromossomos (Fig. 1). Nas duas espécies de *Rhopalurus*, em *T. fasciolatus* e *T. paraguayensis*, os cromossomos portadores dos sítios ribossomais parecem ter tamanho similar; porém, nos exemplares de *T. bahiensis* do Paraná e *T. martinpaechi*, embora ambos os sítios de rDNA 45S estejam localizados em cromossomos de tamanho grande, é possível notar uma pequena diferença entre estes elementos, sendo um cromossomo ligeiramente maior que os demais (Fig. 1B, E). Em *T. confluens*, os cístrons ribosomais estão localizados sobre um cromossomo de tamanho grande e um elemento de tamanho médio/pequeno (Fig. 1C).

Nas células paquitênicas de todas as espécies, os sítios de rDNA ocorrem na região terminal de um bivalente (Fig. 2A). Em alguns núcleos paquitênicos de *T. martinpaechi*, esta região terminal portadora dos cístrons ribossomais apareceu não sinapsada. O estudo de núcleos pós-paquitênicos revelou que os clusters de rDNA podem estar localizados em cromossomos que fazem parte da cadeia cromossômica, tal como em *R. agamemnon* (Fig. 2B), *T. bahiensis* provenientes do Paraná (Fig. 2D), um exemplar de *T. confluens* (Fig. 2H) e *T. martinpaechi* (Fig. J-K), ou em elementos totalmente sinapsados, semelhantes a bivalentes, como em *R. rochai* (Fig. 2C), *T.* 

*bahiensis* coletados em São Paulo (Fig. 2E), um exemplar de *T. confluens* (Fig. 2F-G), *T. fasciolatus* (Fig. 2I) e *T. paraguayensis* (Fig. 2L). Células submetidas à técnica de FISH e analisadas com filtro específico para DAPI mostraram que blocos de heterocromatina brilhantes localizados na região terminal dos cromossomos são coincidentes com os sítios ribossomais (Fig. 2F-G, J-K) de todas as espécies.



**Fig. 1** Metáfases espermatogoniais de escorpiões Buthidae submetidas à técnica de FISH com sonda de rDNA 45S. **A.** *Rhopalurus rochai* (2n=28). **B.** *Tityus bahiensis* coletado no estado do Paraná (2n=6). **C.** *Tityus confluens* (2n=13). **D.** *Tityus fasciolatus* (2n=14). **E.** *Tityus martinpaechi* (2n=6). **F.** *Tityus paraguayensis* (2n=16). As setas indicam a localização dos sítios de rDNA na região terminal de dois cromossomos. Escala=10 μm.



**Fig. 2** Células em paquíteno (**A**) e pós-paquíteno (**B-L**) de escorpiões Buthidae submetidas à técnica de FISH com sonda de rDNA 45S. **A**, **D**. *Tityus bahiensis* proveniente do estado do Paraná. **B**. *Rhopalurus agamemnon*. **C**. *Rhopalurus rochai*. **E**. *Tityus bahiensis* coletado no estado de São Paulo. **F-H**. *Tityus confluens*. **I**. *Tityus fasciolatus*. **J-K**. *Tityus martinpaechi*. **L**. *Tityus paraguayensis*. As setas indicam a localização dos sítios de rDNA 45S. **F** e **J**. Análise com o filtro para FITC, mostrando apenas os sítios de rDNA (seta). **G** e **K**. Análise com o filtro para DAPI, revelando blocos brilhantes na região terminal de dois cromossomos (cabeça de seta). Escala=10 μm.

## DISCUSSÃO

Até o presente momento, apenas uma espécie de escorpião, *Tityus serrulatus*, foi investigada quanto a localização dos genes de rDNA. Essa espécie, que possui reprodução partenogenética, mostrou uma estrutura cariotípica conservada, até mesmo entre populações diferentes, e apenas um cromossomo portador de rDNA 45S (Schneider e Cella 2010). Neste trabalho, nós investigamos o número e a localização dos genes de rDNA 45S em sete espécies de Buthidae, as quais exibiram uma grande diversidade de número diploide que variou de 2n=6 a 2n=28. Além disso, embora todos os indivíduos de *T. bahiensis* das duas localidades estudadas tenham exibido o mesmo número diploide, estes diferiram quanto às associações cromossômicas observadas em células pós-paquitênicas, ou seja, os exemplares do estado do Paraná mostraram uma cadeia composta por seis cromossomos, enquanto que os indivíduos do estado de São Paulo revelaram uma cadeia formada por quatro cromossomos mais uma estrutura semelhante a um bivalente.

Apesar desta diversidade de número diploide, as sete espécies de Buthidae exibiram uma constância quanto a ocorrência de genes de rDNA 45S localizados na região terminal de dois cromossomos. Este resultado foi surpreendente, uma vez que, em diversos grupos de animais e plantas, a localização dos genes de rDNA frequentemente varia entre espécies com características cariotípicas muito similares (Bombarova et al. 2007; Cabrero e Camacho 2008; Datson e Murray 2006; Schneider et al. 2007; Catroli et al. 2011). No entanto, a análise da localização dos sítios de rDNA em células meióticas das sete espécies, foi extremamente importante pois mostrou variações imperceptíveis com o estudo apenas de células mitóticas. Em exemplares de *T. bahiensis* coletados no estado de São Paulo, os cístrons de rDNA estão localizados sobre um bivalente que não faz parte da cadeia cromossômica, indicando que estes elementos provavelmente não estão envolvidos em rearranjos que deram origem a

associação multivalente. Por outro lado, em exemplares de T. bahiensis do estado do Paraná, os cromossomos portadores dos genes de rDNA 45S sofreram rearranjos do tipo fissão/fusão, considerando que, todos os elementos fazem parte da cadeia cromossômica e que um dos cromossomos portadores do sítio ribossomal é ligeiramente maior que o outro. Os resultados encontrados em *T. confluens* foram ainda mais interessantes, visto que, todos os indivíduos exibiram o mesmo número diploide, 2n=13, e configuração similar dos cromossomos na meiose (cinco bivalentes mais uma cadeia composta por três elementos). Porém, o emprego da técnica de FISH revelou que os rearranjos cromossômicos que originaram a associação trivalente observada na meiose, não envolveram os mesmos elementos quando comparamos indivíduos diferentes, levando-se em conta que os genes de rDNA estão localizados na cadeia cromossômica ou em um elemento semelhante a um bivalente. Assim, o emprego de técnicas de citogenética molecular em células meióticas de escorpiões é útil não apenas para observar as homologias cromossômicas e entender os rearranjos responsáveis pela variabilidade cariotípica e associações multivalentes, mas também, para identificar com mais detalhes o grau de diversidade cromossômica que ocorre neste grupo.

Em estudos realizados previamente por Mattos et al. (2013), o número de RONs observadas através da impregnação pelo íon prata em células mitóticas de 11 espécies de escorpiões Buthidae, incluindo aquelas analisadas neste trabalho, foi condizente com os dados obtidos através da FISH. Além disso, nessas sete espécies, parece não haver um heteromorfismo no tamanho dos sítios de rDNA, o que seria indicativo de variações na quantidade de cópias desses genes.

A técnica de FISH permite a detecção de todos os sítios de rDNA e pode ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular (Dutrillaux e Dutrillaux 2012). No entanto, segundo Cabrero e Camacho (2008), a utilização da impregnação pelo íon prata e FISH possibilita a identificação de RONs crípticas, as quais correspondem a pequenas regiões organizadoras de nucléolo marcadas pelo íon prata, mas não reveladas pela FISH. Entre as espécies de Buthidae caracterizadas quanto à localização das RONs ativas, apenas um exemplar de *R. rochai* apresentou uma RON adicional, localizada na região intersticial de um cromossomo (Mattos et al. 2013). Infelizmente, preparações cromossômicas desse exemplar não foram submetidas à técnica de FISH devido à falta de material citogenético disponível. Assim, apesar das vantagens do emprego da FISH para a localização das RONs, em escorpiões, o uso de ambas as técnicas deve ser realizada, visto que podem revelar a presença de RONs crípticas e ajudar a esclarecer se há dispersão das RONs para diferentes regiões do genoma e os mecanismos responsáveis por esse evento.

A associação dos genes de rDNA com regiões de heterocromatina, tal como observado nas sete espécies examinadas nesse trabalho, são comuns na maioria dos organismos. Diversos autores têm proposto que essa associação facilita a ocorrência de rearranjos estruturais, trocas desiguais durante a meiose e transposição, que geralmente levam a uma variação no número de cópias e/ou localização dos sítios de rDNA (Cerbah et al. 1998; Fujiwara et al. 1998; Brianti et al. 2009; Lohe e Roberts 2000; Drosopoulou et al. 2012). Porém, em Scorpiones, pode existir outra explicação para a associação dos genes ribossomais com a heterocromatina, considerando que o índice de rearranjos cromossômicos é muito elevado, mesmo em espécies com pequena quantidade de regiões heterocromáticas detectadas pelo bandamento C ou coloração com fluorocromos base-específicos (Mattos et al. 2013), e a meiose é aquiasmática, ou seja, não ocorre recombinação gênica através do crossing-over. Desta forma, nos escorpiões, tal associação pode ter um papel na preservação da integridade dos cístrons de rDNA. Esta hipótese pode ser parcialmente comprovada pelo fato de que, apesar das sete espécies de Buthidae mostrarem uma grande variação na quantidade de regiões heterocromáticas constitutivas (ver Mattos et al. 2013), em todas essas espécies foram observadas regiões heterocromáticas coincidentes com os genes ribossomais. No entanto, a identificação de sequências repetitivas no genoma dos escorpiões bem como das modificações epigenéticas que ocorrem na heterocromatina associada aos genes ribossomais, podem fornecer dados importantes para esclarecer o significado da coincidência da heterocromatina com as RONs.

### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Douglas Araujo, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, MS, Brasil, e ao Centro de Controle de Zoonoses de Ituiutaba, MG, Brasil, pela coleta de alguns exemplares de Buthidae. Esta pesquisa tem o suporte da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2010/14226-2, 2011/21643-1) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (478630/2010-7). Este trabalho também é parte do "Programa de Pesquisas em Biodiversidade do Semiárido – PPBio Semiárido" (CNPq 558317/2009-0). As coletas têm a permissão do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) (25471-1; 25472-1; 15157-1).

## REFERÊNCIAS

Bombarová M, Marec F, Nguyen P, Špakulová M (2007). Divergent location of ribosomal genes in fish thorny-headed worms, *Pomphorhynchus laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* (Acanthocephala). Genetica 131:141-149.

Brianti MT, Ananina G, Recco-Pimentel SM, Klaczko LB (2009). Comparative analysis of the chromosomal positions of rDNA genes in species of *tripunctata* radiation of *Drosophila*. Cytogenetic and Genome Research 125:149-157.

Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2011). Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. Cytogenetic and Genome Research 134:127–135.

Cabral-de-Melo DC, Moura RC, Martins C (2010). Chromosome mapping of repetitive DNAs in the beatle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rDNA and histone H3 genes in insects, and a repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. Heredity 104:393-400.

Cabrero J, Camacho PJM (2008). Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Research 16:595-607.

Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S (2011). Conserved karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). Journal of Hepertology 45:120-128.

Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S (1998). rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). The American Genetic Association 89:312-318.

Datson PM, Murray BG (2006). Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? Chromosome Research 14:845-857.

Drosopoulou E, Nakou I, Šíchová J, Kubíčková S, Marec F, Mavragani-Tsipidou P (2012). Sex chromosome and associated rDNA form a heterochromatin network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). Genetica 140:169-180.

Dutrillaux AM, Dutrillaux B (2012). Chromosome analysis of 82 species of Scarabeoidea (Coleoptera), with special focus NOR localization. Cytogenetic and Genome Research 136:208-219.

Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. Chromosome Research 6:463-471.

Goodpasture C, Bloom SE (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53:37-50.

Guerra M, Cabral G, Cuacos M, Gonzáles-García M, Gonzáles-Sánchez M, Vega J, Puertas MJ (2010). Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules. Cytogenetic Genome Research 129:82-96.

Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.

Lohe AR, Roberts PA (2000). Evolution of DNA in heterochromatin: the *Drosophila melanogaster* sibling species subgroup as a resource. Genetica 109:125-130.

Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Candido DM, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. Chromosome Research DOI: 10.1007/s10577-013-9342-3.

Moustafa MA, Alaa AM, Sarhan MH, Yaseen AE (2005) Chromosomal studies on four Egyptian scorpion species of genus *Androctonus* (Family: Buthidae). Cytologia 70:161-165.

Newlands G, Martindale CB (1980). The buthid scorpion fauna of Zimbabwe-Rhodesia with checklist and keys to the genera and species, distributions and medical importance (Arachnida: Scorpiones). South African Institute Medical Research 67:51-77.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 83:2934–2938.

Pisano E, Ghigliotii L (2009). Ribossomal genes in notothenioid fishes: Focus on the chromosomal organisation. Marine Genomics 2:75-80.

Piza ST (1947). Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 62:169-176.

Piza ST (1950). Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros. Ciência e Cultura 2:202-206.

Piza ST (1952). Primeiras observações sobre os cromossômios do *Tityus metuendus* Pocock. Scientia Genetica 4:162-167.

Piza ST (1957). The chromosomes of *Rhopalurus* (Scorpiones – Buthidae). The Canadian Entomologist 89:565-568.

Schneider MC, Cella DM (2010). Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. Journal of Heredity 101:491-496.

Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2012). The scorpion cytogenetic database. Available in: www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase.

Schneider MC, Rosa SP, Almeida MC, Costa C, Cella DM (2007). Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Phyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 45:308-316.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha, Candido DM, Cella DM (2009a). A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. Journal of Heredity 100:545–555.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009b). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. Chromosome Research 17:883–898.

Shanahan CM (1989a). Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). Genome 32:890-900.

Shanahan CM (1989b). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. Genome 32:882-889.

Sharma GP, Parshad R, Joneja MG (1959). Chromosome mechanism in the males of three species of scorpions (Scorpiones – Buthidae). Research Bulletin of the Panjab University 10:197-207.

Silva EL, Busso AF, Parise-Maltempi (2012). Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). Cytogenetic and Genome Research 139:22-28.

Verma RS, Babu A (1995). Human chromosomes: Principles and Techniques. 2<sup>a</sup> Edição. New York. Mc Graw-Hill 419pp.

Zhang D, Sang T (1999). Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent in situ hybridization: Implications for phylogeny and concerted evolution. American Journal of Botany 86:735–740.



Tityus martinpaechi (Foto: T. J. Porto)
Tityus paraguayensis (Foto: D. Araujo)
Tityus stigmurus (Foto: T. J. Porto)
Rhopalurus agamemnon (Foto: L. S. Carvalho)



Organização e comportamento do complexo sinaptonêmico durante a meiose aquiasmática de escorpiões Buthidae

Viviane Fagundes Mattos<sup>1\*</sup>, Doralice Maria Cella<sup>1</sup>, Leonardo Sousa Carvalho<sup>2</sup>, and Marielle Cristina Schneider<sup>3\*</sup>

1. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Avenida 24-A, 1515, Caixa Postal 199, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

2. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Campus Amílcar Ferreira Sobral, BR 343, km 3.5, 64800-000, Floriano, Piauí, Brasil.

3. Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Ciências Biológicas,

Av. Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270, Diadema, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding authors. Tel.: +551935264140; Fax: +551935264136

E-mail: vivianefagundesmn@hotmail.com; marielle.unifesp@gmail.com

#### RESUMO

Os escorpiões Buthidae apresentam cromossomos holocêntricos, meiose sináptica e aquiasmática e a maioria das espécies exibem um alto índice de rearranjos cromossômicos originados por translocações recíprocas ou fissões/fusões. Neste trabalho, células testiculares de quatro espécies de butídeos (Rhopalurus agamemnon, 2n=28; Rhopalurus rochai, 2n=28; Tityus bahiensis, 2n=6; e Tityus fasciolatus, 2n=14) que mostraram diferentes configurações cromossômicas na meiose I foram submetidos à técnica de microespalhamento celular, visando estabelecer como ocorre a organização e o comportamento do complexo sinaptonêmico (CS), bem como obter dados que auxiliem na interpretação das variações intraespecíficas e intraindividuais. A análise ultraestrutural de microestendidos celulares revelou CS com uma estrutura tripartida e bem preservada até estágios tardios da prófase I, ausência de placa cinetocórica e nódulos de recombinação, o que comprova a natureza holocêntrica dos cromossomos e ausência de crossing-over. Além disso, em R. agamemnon, R. rochai e T. bahiensis foram visualizados filamentos únicos unindo segmentos de CS totalmente sinapsados, indicando a ocorrência de rearranjos cromossômicos heterozigotos nessas espécies. Embora na amostra de células de *T. fasciolatus* não tenham sido observadas cadeias cromossômicas, a presença de gaps e interlockings revela que esta espécie, assim como as demais, é portadora de rearranjo heterozigoto, envolvendo um segmento cromossômico menor do que nas outras espécies. A análise de microestendidos celulares foi extremamente importante, principalmente em R. rochai, pois permitiu estabelecer a ocorrência de variabilidade intraindividual quanto ao número de elementos como bivalentes e envolvidos nas cadeias cromossômicas. Adicionalmente, verificou-se que o número de cromossomos envolvidos em rearranjos foi maior do que aquele previamente encontrado em células analisadas em microscopia de luz.

Palavras-chave: associação multivalente, cromossomos holocêntricos, rearranjo cromossômico, *Rhopalurus*, *Tityus* 

# ABREVIAÇÕES

- CS = Complexo sinaptonêmico
- MET = Microscopia eletrônica de transmissão
- ML = Microscopia de luz
- "Bivalente" = Elemento semelhante a bivalente

## INTRODUÇÃO

Durante a meiose, os cromossomos da maioria dos organismos seguem uma série específica de eventos – emparelhamento, sinapse, recombinação e disjunção – os quais são propiciados pelo complexo sinaptonêmico (CS), uma estrutura protéica conservada evolutivamente nos diferentes táxons (Kleckner 1996; Hernández-Hernández et al. 2008; Viera et al. 2009). O CS ocorre durante a prófase I e apresenta ultraestruturalmente uma organização tripartida, com dois elementos laterais e um elemento central. Os elementos laterais são formados ao longo do comprimento das duas cromátides-irmãs e ligados ao elemento central através dos filamentos transversais (Zickler e Kleckner 1999; Page e Hawley 2004; Hernández-Hernández et al. 2012).

O CS começa a formar-se no zigóteno e é gradualmente degradado no diplóteno, após haver completado suas funções (Zickler e Kleckner 1999, Bogdanov 2003). O processo de montagem e desmontagem do CS está correlacionado com a progressão da prófase I. Durante o leptóteno, os elementos axiais são organizados e estão associados a um par de cromátides-irmãs. Concomitantemente ao início do emparelhamento dos cromossomos homólogos, que ocorre no zigóteno, os elementos axiais são progressivamente conectados ao elemento central pelos filamentos transversais, através de um processo semelhante ao fechamento de um zíper. No paquíteno, os cromossomos homólogos estão completamente sinapsados, sendo que a cromatina está ligada aos elementos laterais por uma série de *loops*. Nesta subfase da prófase I, ocorre a recombinação do material genético ou *crossing-over*. No diplóteno, os CS são desorganizados, mas os cromossomos homólogos ainda permanecem unidos através dos quiasmas, os quais além de ser uma evidência citológica de que ocorreu recombinação na subfase precedente, previnem a segregação precoce e incorreta dos cromossomos homólogos (Suja e Barbero 2009; Yang & Wang 2009). Embora o CS seja um pré-requisito para a recombinação genética, a sua presença, não determina a ocorrência de *crossing-over*. Em espécies com meiose aquiasmática, o CS pode apresentar comportamento semelhante aquele de organismos que possuem meiose quiasmática ou, ao invés de ser degradado durante o diplóteno, permanece até a metáfase I ou anáfase I. Essa manutenção do CS até fases tardias da meiose I propicia a conexão dos cromossomos homólogos, necessária para a disjunção balanceada dos cromossomos. Em outros organismos, que também possuem um sistema de meiose aquiasmático, o CS é formado durante o leptóteno, mas não persiste até o paquíteno, ou alternativamente, está ausente (John 1990; Zickler e Kleckner 1999; Bogdanov 2003).

Entre os animais que são dióicos, os Lepidoptera e Trichoptera dentro da classe Insecta, e os Scorpiones dentro dos Arachnida, são, até o momento, os únicos grupos em que todas as espécies citogeneticamente analisadas parecem ter meiose aquiasmática em pelo menos um dos sexos (John 1990; Schneider et al. 2009a, b). Além disso, muitas espécies de escorpiões exibem um alto índice de rearranjos cromossômicos originados por translocações recíprocas ou fissões/fusões, e todos os representantes da família Buthidae apresentam cromossomos holocêntricos (Shanahan 1989a, b; Schneider et al. 2012; Mattos et al. 2013). Com o objetivo de estabelecer como ocorre a organização e o comportamento do CS em Buthidae, bem como obter dados que auxiliem na interpretação das variações cromossômicas intraespecíficas e intraindividuais presentes em representantes desta família, quatro espécies de butídeos, que mostraram diferentes configurações cromossômicas na meiose I foram examinadas: dois representantes do gênero Rhopalurus, ambos com 2n=28, R. agamemnon (C. L. Koch, 1839), que mostrou uma cadeia cromossômica complexa, envolvendo todos os elementos do complemento, e R. rochai Borelli, 1910 que exibiu uma variação interindividual, ou seja, dez elementos semelhantes a bivalentes mais uma cadeia

96

composta por oito elementos ou, nove elementos como bivalentes mais uma cadeia formada por dez cromossomos; *Tityus bahiensis* (Perty, 1833), 2n=6, que revelou uma cadeia composta por todos os cromossomos e *Tityus fasciolatus* Pessôa, 1935, 2n=14, que exibiu sete elementos semelhantes a bivalentes.

### MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, indivíduos machos adultos das seguintes espécies de escorpiões da fauna brasileira foram analisados: dois exemplares de R. agamemnon, Mateiros (10°33'S, 46°27'W), Tocantins; dois indivíduos de R. rochai, Guanambi (14°18'S, 42°44'W), Bahia; quatro indivíduos de T. bahiensis, Ilha Grande (24°01'S, 54°10'W), Parque Nacional de Ilha Grande, Guaíra, Paraná; quatro indivíduos de T. fasciolatus, Ituiutaba (18°58'S, 49°28'W), Minas Gerais. Os espécimes foram depositados no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSP, curadora D. M. Barros-Battesti), São Paulo, São Paulo, Brasil. Os exemplares foram dissecados em solução salina (128,3 mM NaCl, 16,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19,9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), os testículos removidos e divididos em duas partes. Uma parte do testículo foi submetida à técnica para obtenção de preparações cromossômicas para análise em microscopia de luz (ML) (ver Mattos et al. 2013) e a outra parte foi submetida a técnica de microespalhamento para visualização do complexo sinaptonêmico e de estruturas associadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET), seguindo Loidl e Jones (1986). Os microestendidos celulares foram impregnados pelo íon prata, de acordo com Howell e Black (1980). A análise ultraestrutural foi realizada em um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100, operado a 80kV, e os registros das imagens foram feitos em chapas fotográficas 4489 (Kodak).

### RESULTADOS

A análise ultraestrutural de microestendidos celulares das guatro espécies estudadas neste trabalho revelou CS com estrutura tripartida típica e bem preservada até estágios tardios da prófase I, ausência de placa cinetocórica e nódulos de recombinação. Em todos os núcleos paquitênicos de R. agamemnon e R. rochai foi difícil determinar o comprimento total dos CS, devido a ocorrência de segmentos descontínuos ou filamentos únicos que conectavam elementos laterais completamente sinapsados; estes eixos únicos frequentemente não foram preservados pela metodologia empregada para a obtenção dos microestendidos celulares. Nas duas espécies de Rhopalurus, três ou mais CS estavam associados através de eixos não sinapsados, formando uma associação multivalente (Fig. 1A-B). Na amostra de células pós-paquitênicas de R. agamemnon, um número extremamente variável de cadeias cromossômicas constituídas por um número diferente de cromossomos e elementos semelhantes a bivalentes foi verificado; esta variação certamente ocorre devido a dissociação precoce de alguns cromossomos da cadeia (Fig. 1C). Nos núcleos em pós-paquíteno de R. rochai foi possível visualizar uma variação inter e intraindividual: um macho mostrou 10 elementos semelhantes a bivalentes mais uma cadeia composta por oito cromossomos (Fig. 1D) e oito elementos semelhantes a bivalentes e uma cadeia de 12 cromossomos, enquanto outro indivíduo revelou nove elementos semelhantes a bivalentes mais uma cadeia de 10 cromossomos, oito elementos como bivalentes mais duas cadeias cromossômicas, uma com oito e outra com quatro elementos (Fig. 1E) e oito elementos como bivalentes mais uma cadeia cromossômica composta por 12 elementos. Uma análise detalhada de células de ambos os indivíduos revelou que a associação multivalente envolvendo 12 cromossomos corresponde à união de cadeias constituídas por oito e quatro cromossomos (Fig. 1F-I). Além disso, um gap proeminente foi observado em ambos os elementos laterais de um segmento cromossômico completamente sinapsado, parecendo muitas vezes como um bivalente típico não associado à cadeia cromossômica (Fig. 1F-G).

Microestendidos paquitênicos de T. bahiensis mostraram dois CS curtos e dois ou três extremamente longos, os quais exibiram segmentos descontínuos. No entanto, a presença de filamentos únicos unindo os CS, indica que todos os elementos convergem para uma única associação multivalente (Fig. 2A-D). Adicionalmente, eixos não sinapsados foram verificados na região mediana de um ou dois CS, os quais correspondem a pontos de interlockings entre dois ou três CS, respectivamente (Fig. 2C-D). Núcleos paquitênicos de T. fasciolatus analisados em MET revelaram a montagem total dos CS, permitindo a identificação de sete elementos como bivalentes. Além disso, até dois CS exibiram um gap na região mediana e um CS apresentou uma região não sinapsada, a qual estava entrelaçada com outro bivalente, indicando a ocorrência de interlocking (Fig. 2E-F). Células pós-paquitênicas das duas espécies mostraram CS preservados, formando uma associação multivalente composta por seis elementos em T. bahiensis e sete elementos semelhantes a bivalentes em T. fasciolatus (Fig. 3). Nessa última espécie, usualmente um elemento de tamanho grande e um pequeno apresentaram um gap em um dos elementos laterais que constituem o CS (Fig. 3B-C).



**Fig. 1** Microestendidos celulares de *Rhopalurus agamemnon* (**A-C**) e *Rhopalurus rochai* (**D-I**) impregnados pelo íon prata. **A-B.** Núcleo paquitênico, com sua respectiva interpretação esquemática, exibindo complexos sinaptonêmicos com filamentos únicos não sinapsados (linha fina), *gaps* (linha tracejada) e associação (linha pontilhada) entre elementos laterais completamente sinapsados. **C.** Célula pós-paquitênicas com associações multivalentes envolvendo um número variável de cromossomos. **D-E.** Células pós-paquitênicas com 10 elementos como bivalentes e uma cadeia de oito cromossomos (**D**), e oito elementos como bivalentes mais uma cadeia de oito e outra de quatro cromossomos (**E**). **F-I.** Detalhes das cadeias cromossômicas com 12 elementos e suas respectivas representações esquemáticas. Seta=*gaps*, filamentos únicos e associações multivalentes. Escala=5 μm.



**Fig. 2** Microestendidos celulares paquitênicos de *Tityus bahiensis* (A-D) e *Tityus fasciolatus* (E-F), impregnados pelo íon prata. A-D. Núcleos, com suas respectivas representações esquemáticas, mostrando complexos sinaptonêmicos com filamentos únicos (linha fina), regiões de *gaps* (linha tracejada), associações multivalentes (linha pontilhada) e *interlocking* (linha cinza; cabeça de seta). Os detalhes em C e D exibem a região de *interlocking* (linha cinza; cabeça de seta). E-F. Núcleos com sete complexos sinaptonêmicos, exibindo regiões de *gap* (seta) e *interlocking* (cabeça de seta). As setas em A-D mostram regiões de *gaps*, filamentos únicos e associações multivalentes. Escala=5 µm.



**Fig. 3** Microestendidos de núcleos pós-paquitênicos de *Tityus bahiensis* (**A**) e *Tityus fasciolatus* (**B-C**), impregnados pelo íon prata. **A.** Associação multivalente formada por seis cromossomos. **B-C.** Células com sete elementos como bivalentes. As setas indicam *gaps* em um elemento lateral de um complexo sinaptonêmico de tamanho pequeno (**B**) e grande (**C**). Escala=5 µm.

## DISCUSSÃO

A análise ultraestrutural do CS foi realizada previamente em apenas seis espécies de escorpiões, Bothriurus araguayae, Bothriurus rochensis (Bothriuridae) e Urodacus manicatus (Urodacidae), que possuem cromossomos monocêntricos, Lychas marmoreus, Lychas variatus e T. bahiensis (Buthidae), que exibem cromossomos holocêntricos (Benavente 1982; Shanahan e Hayman 1990; Schneider et al. 2009a, b). Em todos esses trabalhos, técnicas de microespalhamento celular para investigação do CS foram utilizadas, com exceção do estudo realizado por Benavente (1982) que empregou cortes histológicos. Nos escorpiões que possuem cromossomos holocêntricos, incluindo aqueles investigados no presente trabalho, não é possível visualizar placas cinetocóricas associadas aos CS, quando a técnica de microespalhamento celular é empregada, independentemente se o método de contrastação é feito por impregnação pelo íon prata ou ácido fosfotúngstico (Shanahan e Hayman 1990, Schneider et al. 2009a). Entretanto, considerando que os CS de T. bahiensis foram examinados através de duas metodologias, isto é, microespalhamento celular (Schneider et al. 2009a) e cortes histológicos (Benavente 1982), e o fato de que com esta última técnica, a presença de uma extensa placa cinetocórica que cobria grande parte da superfície cromossômica foi verificada, é possível concluir que a ausência de placa cinetocórica nas quatro espécies aqui analisadas confirma a natureza holocêntrica dos cromossomos. Por outro lado, a placa cinetocórica foi bem visível e definida no CS de escorpiões que tem cromossomos monocêntricos (Shanahan e Hayman 1990; Schneider et al. 2009b). Adicionalmente, em todos os estudos ultraestruturais já realizados em Scorpiones, nódulos de recombinação não foram encontrados, corroborando a ausência de crossingover e presença de meiose aquiasmática nas espécies deste grupo.

O estudo de microestendidos celulares em MET de *R. agamemnon*, *R. rochai*, *T. bahiensis* e *T. fasciolatus* revelou que, apesar da ocorrência de meiose aquiasmática, o

CS é formado, possui estrutura tripartida típica, e aparece bem preservado até estágios tardios da prófase I. Resultado similar tem sido esporadicamente registrado para outros táxons que possuem cromossomos holocêntricos e meiose aquiasmática, como, por exemplo, em Lepidoptera, Mantodea e Trichoptera (Gassner 1969; Rasmussem 1977; Rasmussem e Holm 1979; John 1990; Marec e Traut 1993; Wolf et al. 1997; Melters et al. 2012). Em Scorpiones, assim como em espécies de outros grupos, a manutenção do CS tardio é importante para a associação e segregação correta e balanceada dos elementos como bivalentes e cadeias cromossômicas.

Em células paquitênicas de todas as espécies aqui analisadas, uma variação no número de CS foi encontrada, com exceção de *T. fasciolatus*. Tal variação certamente ocorre devido aos rearranjos cromossômicos heterozigotos presentes em *R. agamemnon, R. rochai* e *T. bahiensis*, e pode ser comprovada pela ocorrência de filamentos únicos ligando regiões de CS totalmente sinapsados, bem como por associações cromossômicas múltiplas, as quais foram observadas principalmente em células pós-paquitênicas. Levando-se em conta algumas características, como a presença ou ausência de variação intraespecífica no número diploide e tamanho dos cromossomos, Mattos et al. (2013) atribuíram a formação de associações multivalentes em prófase I, a rearranjos heterozigotos do tipo translocações recíprocas em ambas as espécies do gênero *Rhopalurus*, e fissões/fusões cromossômicas em *T. bahiensis*.

Em alguns casos, a formação do CS não necessita de homologia cromossômica e um emparelhamento não homólogo pode ocorrer, o que é facilitado na ausência de *crossing-over* e de meiose aquiasmática (Rasmussem e Holm 1979). Em escorpiões, a ausência de *crossing-over* e meiose aquiasmática é uma característica comum para todas as espécies analisadas citogeneticamente, provavelmente ocorrendo em ambos os sexos. Assim, é possível sugerir que o emparelhamento dos cromossomos ocorre em duas etapas, ou seja, em fases iniciais da prófase I há sinapse específica dos

104

cromossomos entre regiões homólogas, resultando em um número variável de CS e que geralmente se apresentam como filamentos curtos, enquanto que em fases mais tardias da prófase I ocorre o emparelhamento independente de homologia cromossômica, o que facilita a visualização de longos CS, envolvendo quase todo o comprimento cromossômico.

А metodologia empregada neste trabalho para а obtenção dos microespalhamentos celulares pode ocasionalmente não preservar filamentos únicos, resultando em gaps entre regiões de CS totalmente sinapsados. Complexos sinaptonêmicos com qaps foram previamente descritos para espécies de escorpiões das famílias Bothriuridae, Buthidae e Urodacidae, portadoras de rearranjos heterozigotos (Shanahan e Hayman 1990; Schneider et al. 2009a, b). Em T. fasciolatus, embora associações multivalentes não tenham sido observadas na meiose I, é possível inferir que rearranjos heterozigotos também ocorrem, uma vez que gaps foram observados em até dois "bivalentes". No entanto, em T. fasciolatus, pelo fato dessas regiões cromossômicas não homólogas estarem localizadas na região mediana do bivalente e possivelmente envolver um pequeno segmento cromossômico, apenas elementos quase que completamente sinapsados foram visualizados na amostra de células investigadas.

Em microestendidos celulares de *T. bahiensis* e *T. fasciolatus* foram verificados *interlockings*, os quais ocorrem entre um elemento como bivalente ou segmento cromossômico totalmente sinapsado e um segmento cromossômico não sinapsado. Na maioria das espécies, *intelockings* são visualizados apenas durante o zigóteno. No entanto, em indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos heterozigotos, um aumento significativo na frequência de *interlockings* tem sido encontrado no paquíteno (Zickler e Kleckner 1999). Desta forma, nas duas espécies de *Tityus*, principalmente em *T. fasciolatus*, a presença de *interlockings* é uma evidência complementar que confirma a existência de rearranjos cromossômicos.

A análise de microestendidos celulares em MET foi extremamente importante, especialmente para R. rochai, visto que forneceu informações adicionais com relação as associações multivalentes encontradas em células observadas em ML (Mattos et al. 2013). Através do estudo de células em ML, uma variabilidade interindividual quanto ao número de elementos como bivalentes e cromossomos envolvidos nas cadeias multivalentes foi verificada em R. rochai, enquanto que nos núcleos investigados em MET, essa variabilidade foi tanto inter quanto intraindividual. Através dos resultados obtidos com a análise de células pós-paquitências em MET, é possível inferir que em ambos os exemplares de R. rochai aqui estudados, o número total de elementos envolvidos em rearranjos heterozigotos é igual a 12. A diferença intraindividual no número de associações multivalentes e elementos envolvidos nessas cadeias cromossômicas (uma cadeia com 12, dez ou oito cromossomos; ou duas cadeias, uma com oito e outra com quatro elementos), provavelmente está relacionada ao grau de homologia entre os elementos cromossômicos. Assim, os cromossomos que frequentemente formam uma cadeia composta por oito elementos, possivelmente possuem um grau maior de homologia entre si do que com aqueles elementos que compõem a cadeia de quatro cromossomos. A variação no número de elementos como bivalentes (oito, nove ou dez) deve-se a dissociação precoce de alguns elementos cromossômicos presentes na cadeia, os quais se comportam como "bivalente". Essa hipótese pode também ser suportada pela ocorrência de um "gap" proeminente observado em um segmento do CS presente na associação multivalente verificada em R. rochai. Em conclusão, a análise de CS em MET, em escorpiões butídeos, é essencial para comprovar a natureza holocêntrica dos cromossomos, explicar como ocorre a formação das complexas associações multivalentes e auxiliar na interpretação dos rearranjos cromossômicos responsáveis pela variabilidade inter e intraindividual.
## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Douglas Araujo, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, MS, Brasil, e ao Centro de Controle de Zoonoses de Ituiutaba, MG, Brasil, pela coleta de alguns exemplares de Buthidae, e ao técnico Antonio T. Yabuki, do Centro de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, pelo auxílio nas análises citogenéticas ultraestruturais. Esta pesquisa tem o suporte da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2010/14226-2, 2011/21643-1) е Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (478630/2010-7). Este trabalho também é parte do "Programa de Pesquisas em Biodiversidade do Semiárido – PPBio Semiárido" (CNPg 558317/2009-0). As coletas têm a permissão do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) (25471-1; 25472-1; 15157-1).

## REFERÊNCIAS

Benavente R (1982). Holocentric chromosomes of arachnids: presence of kinetochore plates during meiotic divisions. Genetica 59:23-27.

Bogdanov YF (2003). Variation and evolution of meiosis. Russian Journal of Genetics 39:363-381.

Gasnner G (1969). Synaptonemal complexes in the achiasmatic spermatogenesis of *Bolbe nigra* Gilgio-Tos (Mantoidea). Chromosoma 26:22-34.

Hernández-Hernández A, Hernández RO, Vázquez-Nin GH (2012). Epigenetics of the synaptonemal complex. In: Swan A. Meiosis – Molecular mechanisms and cytogenetic diversity. InTech, p.3-16.

Hernández-Hernández A, Rincón-Arano H, Recillas-Targa F, Ortiz R, Valdes-Quezada C, Echeverría OM, Benavente R, Vázquez-Nin GH (2008). Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. Chromosoma 117:77-87.

Howell WM, Black D (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.

John B (1990). Meiosis. Cambridge University Press, Melbourn.

Kleckner N (1996). Meiosis: how could it work? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:8167-8174.

Loidl J, Jones GH (1986). Synaptonemal complex spreading in *Allium* I. Triploid *A. sphaerocephalon*. Chromosoma 93:420-428.

Marec F, Traut W (1993). Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Heredity 73:394-404.

Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Candido DM, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. Chromosome Research DOI: 10.1007/s10577-013-9342-3.

Melters DP, Paliulus LV, Korf IFK, Chan SWL (2012). Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Research 20: 579-593.

Page SL, Hawley RS (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. Annual Review of Cell and Developmental Biology 20:525-558.

Rasmussem SW, Holm SR (1979). Chromosome pairing in autotetraploid *Bombyx* females. Mechanism for exclusive bivalent formation. Carlsberg Research Communications 44:101-125.

Rasmussem SW (1977). Meiosis in *Bombyx mori* females. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 277:343-350.

Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2012). The scorpion cytogenetics database. Disponível em: http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009a). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. Chromosome Research 17:883–898.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha, Candido DM, Cella DM (2009b). A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. Journal of Heredity 100:545–555.

Shanahan CM (1989a). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. Genome 32:882-889.

Shanahan CM (1989b). Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family: Scorpionidae). Genome 32:890-900.

Shanahan CM, Hayman DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmate meiosis and structural heterozygosity. Genome 33:914–926.

Suja JA, Barbero JL (2009). Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. Genome Dynamics 15:94-116.

Viera A, Page J, Rufas JS (2009). Inverted meiosis: the true bugs as a model to study. In: Benavente R, Volff JN. Meiosis. Karger p.137-156.

Wolf KW, Novák K, Marec F (1997). Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. Heredity 79:135-143.

Yang F, Wang PJ (2009). The mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. In: Benavente R, Volff JN. Meiosis. Karger, p. 69-80.

Ziclker D, Kleckner N (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Annual Review of Genetics 33:603-754.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as quatro famílias (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Liochelidae) de Scorpiones registrados na fauna brasileira, Buthidae contém a maior diversidade de espécies e possui ampla distribuição geográfica. No Brasil, 82 espécies, pertencentes a oito gêneros têm sido registradas. Os gêneros Ananteris, Rhopalurus e Tityus possuem a maior riqueza de espécies, incluindo, 17, seis e 54 representantes, respectivamente (Porto et al. 2010). O gênero Tityus é o mais diverso não apenas no Brasil, mas também entre os escorpiões de todo o mundo. De acordo com caracteres morfológicos e/ou distribuição geográfica, Lourenço (2006) dividiu o gênero Tityus em cinco subgêneros: Archaeotityus, Atreus, Brazilotityus, Caribetityus e Tityus. Até agora, três espécies de Tityus do subgênero Archaeotityus, três de Atreus e nove de Tityus tem sido examinadas citogeneticamente (Schneider et al. 2012, Mattos et al. 2013). Apesar da presença de certa diversidade interespecífica, o cariótipo 2n=20 é o tipo predominante no subgênero Archaeotityus e Atreus, ocorrendo em T. maranhensis e Τ. mattogrossensis - subgênero Archaeotityus, T. magnimanus e T. ythieri - subgênero Atreus. Os outros representantes desses subgêneros mostraram 2n=16 em T. paraguayensis – subgênero Archaeotityus e 2n=15-16 em T. metuendus – subgênero Atreus. Os escorpiões do subgênero Tityus revelaram uma variabilidade cariotípica significante, incluindo 2n=5-19 em T. bahiensis, 2n=6 em T. martinpaechi, 2n=12 em T. serrulatus, 2n=13 em T. confluens, 2n=14 em T. fasciolatus e T. trivittatus, 2n=16 em T. costatus e T. stigmurus, e 2n=26-27 em T. neglectus. Um baixo número diploide pode representar uma característica comum na maioria das espécies deste último subgênero, diferindo de Archaeotityus e Atreus.

As análises citogenéticas clássica, molecular e ultraestrutural realizadas em espécies de escorpiões Buthidae, evidenciaram que os cromossomos de todos os

representantes desta família são holocêntricos, devido à ausência de uma constrição primária e região centromérica localizada. Além disso, mostrou que a meiose dos machos é do tipo sináptica e aquiasmática, devido aos cromossomos estarem pareados durante o estágio de paquíteno e os bivalentes não exibirem uma configuração cromossômica indicativa de *crossing-over*. Variabilidade intraespecífica no número diploide não foi observada nos exemplares de butídeos analisados; contudo, configurações multivalentes, as quais podem ser formadas por um número variável de cromossomos, foram verificadas nas células pós-paquitênicas da maioria das espécies, evidenciando a presença de rearranjos heterozigotos em *A. balzanii, R. agamemnon, R. rochai, T. bahiensis, T. confluens, T. maranhensis, T. martinpaechi e T. paraguayensis*. Embora em *T. fasciolatus* não tenham sido observadas cadeias cromossômicas, a análise ultraestrutural de células paquitênicas e pós-paquitênicas revelou que esta

O emprego das técnicas de impregnação pelo íon prata e de FISH para localização das RONs e cístrons ribossomais de rDNA 45S, respectivamente, em sete espécies de butídeos, revelaram que apesar da grande variabilidade de número diploide, as RONs e os genes de rDNA 45S estavam localizados na região terminal de dois cromossomos. Além disso, a utilização da técnica de FISH em células meióticas foi de extrema importância, pois, mostrou variações quanto a localização dos sítios de rDNA 45S imperceptíveis com o estudo apenas de células mitóticas. Indivíduos com mesmo número diploide podem diferir quanto à organização das associações cromossômicas observadas em células pós-paquitênicas, bem como, quanto à localização dos sítios ribossomais, seja em elementos como bivalentes ou em elementos presentes na cadeia cromossômica. Este resultado evidencia que os cromossomos envolvidos nos rearranjos que deram origem as associações multivalentes não são os mesmos quando comparadas diferentes populações ou indivíduos de uma mesma espécie.

O uso das técnicas de bandamento-C e de coloração por fluorocromos baseespecíficos mostrou diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e regiões AT- ou GC-ricas nos cromossomos de butídeos. De modo geral, espécies com conspícuos blocos de heterocromatina têm um índice menor de rearranjos cromossômicos e vice-versa. Adicionalmente, nas sete espécies de butídeos analisados, os genes de rDNA 45S estavam associados com regiões de heterocromatina; tal associação provavelmente tem um papel na manutenção da integridade dos cístrons de rDNA 45S.

Apesar da grande variabilidade de configurações cromossômicas meióticas encontradas nas espécies de Buthidae e presença de meiose aquiasmática, a manutenção do CS até fases mais tardias da prófase I foi verificada, o que assegura a associação e segregação correta e balanceada dos elementos como bivalentes e cadeias cromossômicas. Essa hipótese pode ser confirmada através da análise de células em metáfase II, que evidenciaram o número haplóide correto de cromossomos para cada espécie investigada.

Levando-se em conta todos os resultados encontrados nas espécies de Buthidae, isto é: 1) variabilidade interespecífica de número diploide, principalmente nas espécies do gênero *Tityus*; 2) diversidade intraespecífica quanto à presença ou ausência de elementos como bivalentes e cadeias cromossômicas, observada em todas as espécies, com exceção de *T. costatus* e *T. stigmurus*, e quanto a localização dos cístrons ribossomais de rDNA 45S em *T. bahiensis* e *T. confluens*; 3) variabilidade intraindividual quanto ao número de elementos como bivalentes e cromossomos envolvidos em associações multivalentes em *R. rochai, T. bahiensis, T. maranhensis* e *T. paraguayensis*; é possível concluir que o emprego das três metodologias, análise citogenética clássica, molecular e ultraestrutural, é de extrema importância, pois, fornecem dados complementares quanto ao grau da diversidade cromossômica e evolução cariotípica das espécies de Buthidae.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertson DG, Thomson JN (1982). The kinetochores of *Caenhorhabditis elegans*. Chromosoma 86:409-482.

Altiero T, Rebecchi L (2003). First evidence of achiasmatic male meiosis in the water bears *Richtersius coronifer* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). Hereditas 139:116-120.

Bongiorne S, Fiorenzo P, Pippoletti D, Prantera G (2004). Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. Chromosoma 112:331-341.

Brieger FG, Graner EA (1943). On the cytology of *Tityus bahiensis* with special reference to meiotic prophase. Genetics 28:269-274.

Cabral-de-Melo DC, Moura RC, Martins C (2010). Chromosome mapping of repetitive DNAs in the beatle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rDNA and histone H3 genes in insects, and a repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. Heredity 104:393-400.

Candido DM (1999). Escorpiões. In: Joly CA, Bicudo CEM. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Invertebrados Terrestres. São Paulo. FAPESP p. 22-34.

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

Cruz EFS (1994). Biologia de escorpiões. In: Barraviera B. Venenos Animais – uma visão integrada. Rio de Janeiro. Editora de Publicações Científicas Ltda p.135-150.

Cunha AB, Pavan C (1954). Duas novas configurações cromossômicas em *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). Ciência e Cultura 6:269-274.

Dernburg AF (2001). Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes. The Journal of Cell Biology 153:33-38.

Fet V, Gantenbein B, Gromov AV, Lowe G, Lourenço WR (2003). The first molecular phylogeny of Buthidae. Euscorpius 4:1-10.

Fossey A, Liebenberg H, Jacobs DH (1989). Karyotype and meiosis studies in three south african *Pyrgomorpha* species (Orthoptera: Pyrgomorphidae). Genetica 78:179-183.

Gama V, Landim CC, Ferreira A (1981). Estudos morfológicos da estrutura dos cinetochores de *Enallagma cheliferum* (Odonata). Naturalia 6:75-87.

Guénin HA (1961). Contribution a la connaissance cytologique des scorpions: les chromosomes de *Buthus occitanus Amor*. (I). Vie et Milieu 12:89-96.

Gupta AKD, Sarker SK (1965). A study of the meiotic chromosomes of the scorpion *Buthus tamulus* Fabr. Current Science 2:54-55.

Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.

Ituarte S, Papeschi AG (2004). Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia* (*Fuscagobia*) *fuscata* (Stal) (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). Genetica 122:199-206.

John B (1990) Meiosis. Melbourn: Cambridge University Press, Melbourn.

Kingswood SC, Kumamoto AT, Sudman PD, Fletcher KC, Greenbaum IF (1994). Meiosis in chromosomally heteromorphic goitered gazelle, *Gazella subgutturosa* (Artiodactyla, Bovidae). Chromosome Research 2:37-46.

Kovarík F, Stahlavský F, Korínková T, Král J, Ende T (2009). *Tityus ythieri* Lourenço, 2007 is a synonym of *Tityus magnimanus* Pocock, 1897 (Scorpiones: Buthidae): a combined approach using morphology, hybridization experiments, chromosomes, and mitochondrial DNA. Euscorpius 77:1-12.

Král J, Musilová J, Štáhlavský F, Řezáč M, Akan Z, Edwards RL, Coyle FA, Almerje CR (2006). Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). Chromosome Research 14:859-880.

Loidl J, Jones GH (1986). Synaptonemal complex spreading in *Allium*. I. Triploid *A. sphaerocephalon*. Chromosoma 93:420-428.

Lourenço WR (2006). Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C. L. Kock, 1836 (Scorpiones, Buthidae). Boletin de la Sociedad Entomológica Aragonesa 39:55-67.

Luceño M, Guerra M (1996). Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. Caryologia 49:301-309.

Makino S (1956). A review of the chromosome numbers in animals. Tokyo: Hokurykan.

Moore G, Aragón-Alcaide L, Roberts M, Reader S, Miller T, Foote T (1997). Are rice chromosomes components of a holocentric chromosome ancestor? Plant Molecular Biology 35:17-23.

Moustafa MA, Alaa AM, Sarhan MH, Yaseen AE (2005). Chromosomal studies on four Egyptian scorpion species of genus *Androctonus* (Family: Buthidae). Cytologya 70:161-165.

Newlands G, Martindale CB (1980). The buthid scorpion fauna of Zimbabwe-Rhodesia with checklist and keys to the genera and species, distributions and medical importance (Arachnida: Scorpiones). South African Institute for Medical Research 67:51-77.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 83:2934–2938. Piza ST (1939a). Comportamento dos cromossomos na primeira divisão do espermatócito do *Tityus bahiensis*. Scientia Genetica 1:255-261.

Piza ST (1939b). Considerações em torno da meiose do *Tityus bahiensis* (Scorpiones-Buthidae) e uma nova teoria sobre a movimentação dos cromossômios. Jornal de Agronomia 2:343-370.

Piza ST (1940). Poliploidia natural em *Tityus bahiensis* (Scorpiones) associada a aberrações cromossômicas espontâneas. Revista de Biologia e Hygiene 10:143-155.

Piza ST (1943a). Meiosis in the male of the Brazilian scorpion *Tityus bahiensis*. Revista de Agricultura 18:249-276.

Piza ST (1943b). A propósito da meiose de *Tityus bahiensis*. Revista de Agricultura 18:249-276.

Piza ST (1944). A case of spontaneous end-to-end permanent union of two nonhomologous chromosomes in the Brazilian scorpion *Tityus bahiensis* accompanied by irregularities in pairing. Revista de Agricultura 19:133-147.

Piza ST (1947a). Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 62:169-176.

Piza ST (1947b). Interessante comportamento dos cromossômios na espermatogênese do escorpião *Isometrus maculatus* De Geer. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 62:177-182.

Piza ST (1947c). Uma raça cromossômica natural de *Tityus bahiensis* (Scorpiones-Buthidae). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 62:183-192.

Piza ST (1948a). Primeiras observações sobre os cromossômios de *Tityus trivittatus* Krpln (Scorpiones – Buthidae). Revista de Agricultura de São Paulo 24:177-180.

Piza ST (1948b). Uma nova raça cromossômica natural de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). Revista de Agricultura de São Paulo 24:181-186.

Piza ST (1948c). Variações cromossômicas no *Tityus bahiensis* de São Joaquim. Revista de Agricultura de São Paulo 24:187-194.

Piza ST (1949). "Ouro Preto", nova e interessante raça cromossômica de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). Scientia Genetica 3:147-159.

Piza ST (1950a). Variações cromossômicas do *Tityus bahiensis* de Ribeirão Preto. Ciência e Cultura 2:57-59.

Piza ST (1950b). Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros. Ciência e Cultura 2:202-206.

Piza ST (1952). Primeiras observações sobre os cromossômios do *Tityus metuendus* Pocock. Scientia Genetica 4:162-167. Piza ST (1955). Notable geographical expansion of a peculiar type of chromosomal constitution of the cosmopolitan scorpion *Isometrus maculatus*. Arquivos do Museu Nacional 42:611-612.

Piza ST (1957). The chromosomes of *Rhopalurus* (Scorpiones – Buthidae). The Canadian Entomologist 89:565-568.

Porto TJ, Brazil TK (2010). Os escorpiões de importância médica e seus venenos. In: Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. EDUFBA p.65-73.

Porto TJ, Brazil TK, Souza CAR (2010). Diversidade de escorpiões do Brasil. In: Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. EDUFBA p.47-63.

Prendini L (2006). Why study scorpions? Disponível em: http://scorpion.amnh.org/page3/page3.html.

Prendini L, Wheeler WC (2005). Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomy anarchy, and standards for peer review in online publishing. Cladistics 21:446-494.

Reed KM, Sites JWJr, Greenbaum IF (1992). Synapsis, recombination, and meiotic segregation in the mesquite lizard, *Sceloporus grammicus*, complex. I. Pericentric inversion heteromorphism of the F5 cytotype. Cytogenetics and Cell Genetics 61:40-45.

Rein JO (2012) The Scorpion Files. Disponível em: http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/.

Riess RW, Barker KR, Bieselle JJ (1978). Nuclear and chromosomal changes during sperm formation in the scorpion, *Centruroides vittatus* (Say). Caryologia 31:147-160.

Sato I (1940). Studies on the cytoplasmic phenomena in the spermatogenesis of the Oriental scorpion, *Buthus martensii*, with special reference to the structure of the chondriosome ring and the dictyokinesis. Journal of Science of the Hiroshima University 8:1-116.

Schneider MC, Cella DM (2010). Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated the only one chromosome. Journal of Heredity 4:491-496.

Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2012). The scorpion cytogenetic database. Disponível em: http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html.

Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. Chromosome Research 17:883-898.

Shanahan CM (1989a) Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). Genome 32:890-900.

Shanahan CM (1989b) Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. Genome 32:882-889.

Shanahan CM, Hayman DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmate meiosis and structural heterozygosity. Genome 33:914-926.

Sharma GP, Parshad R, Joneja MG (1959). Chromosome mechanism in the males of three species of scorpions (Scorpiones – Buthidae). Research Bulletin of the Panjab University 10:197-207.

Silva EL, Busso AF, Parise-Maltempi (2012). Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). Cytogenetic and Genome Research 139:22-28.

Soleglad ME, Fet V (2003). High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). Euscorpius 11:1-175.

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

Takahashi CS (1976). Cytogenetical studies on the effects of high natural radiation levels in *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae) from Morro do Ferro, Brazil. Radiation Research 67:371-381.

Venkatanarasimhiah CB, Rajasekarasetty MR (1964). Contributions to the cytology of Indian scorpions. Experientia 21:154.

Whrench DL, Kethley JB, Norton RA (1994). Cytogenetics of holokinetic chromosomes and inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with generalizations on eukaryotes. In: Houck MA (ed) Mites: ecological and evolutionary analyses of life-history patterns. Chapman e Hall, London, p.282-343.

Wilson EB (1931). The distribution of sprem-forming materials in scorpions. Journal of Morphology and Physiology 52:429-483.

Wolf KW (1996). The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. International Journal of Insect Morphology and Embryology 25:37-62.

Wolf KW, Nova KK, Marec F (1992). Chromosome structure in spermatogenesis of *Anabolia furcata* (Trichoptera). Genome 35:46-52.