Almir Rogério Pepato

Posição filogenética dos ácaros Actinotrichida
(Chelicerata) e espermatologia comparada dos
Halacaridae (Actinotrichida)

São Paulo

2009

Almir Rogério Pepato

Posição filogenética dos ácaros Actinotrichida
(Chelicerata) e espermatologia comparada dos
Halacaridae (Actinotrichida)

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Falavigna da Rocha

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Pepato, Almir Rogério

Posição filogenética dos ácaros
Actinotrichida (Chelicerata) e espermatologia
comparada dos Halacaridae (Actinotrichida)
289 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Zoologia.

1. Chelicerata 2. Halacaridae 3. Filogenia.
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a) Dr(a)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Falavigna da Rocha
Orientador

Dedicatória

A Sophia Frigi Pepato.

Epígrafe

Como a essência – ao contrário dos fenômenos – não se manifesta diretamente, e desde que o fundamento oculto das coisas deve ser descoberto mediante uma atividade peculiar, tem de existir a ciência e a filosofia. Se a aparência fenomênica e a essência das coisas coincidissem diretamente, a ciência e a filosofia seriam inúteis.

Karel Kosik

A Dialética do Concreto

Agradecimentos

À minha filha Sophia Frigi Pepato, e à minha companheira Daniela Osvald Ramos pela paciência sempre amorosa.

Ao Dr. Carlos Eduardo Falavigna da Rocha pela orientação dedicada e paciente.

À CAPES e à FAPESP, a primeira pelo auxílio financeiro concedido através de bolsa de estudo durante os meses iniciais e a segunda pelo financiamento do restante do trabalho, através do processo 05/03458-1. As coletas na Espanha só foram possíveis graças a auxílio recebido através do Programa de Mobilidade Internacional de Pós-graduandos do Banco Santander. A estadia na Alemanha contou com o auxílio de recursos da Pró-reitoria de Pós-graduação e do Programa de Apoio à Pós-graduação da CAPES.

À Dra. Ilse Bartsch (Forschungsinstitut Senckenberg, Hamburg) pela acolhida junto ao seu laboratório, o auxílio quanto à obtenção da literatura e o envio de material biológico. É impossível não render aqui homenagem à sua dedicação obstinada quanto a taxonomia dos ácaros Halacaridae, inspiradora em vários aspectos deste trabalho.

Ao Dr. Jason Dunlop (Museum für Naturkunde, Leibniz Institute for Research on Evolution and Biodiversity at the Humboldt University, Berlin) pela colaboração extremamente estimulante quanto à filogenia e morfologia dos Chelicerados, que acabou resultando no capítulo primeiro desta tese.

Ao Dr. Gerd Alberti (Zoologisches Institut und Museum, Universität Greifswald) pelas sugestões quanto aos tópicos relacionados à ultra-estrutura dos ácaros.

À Dra. Célia Besteiro (Universidade de Santiago de Compostela, Campus Lugo) pela oportunidade de trabalho conjunto na costa galega, sem a qual esta tese seria impossível. Aos Dr. Sergio Palma (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile) e Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos (Universidade Federal de Pernambuco, Recife) pela generosa acolhida em seus laboratórios. Devo expressar também o meu profundo agradecimento a todo o pessoal do CECLIMar-UFRG, em particular às professoras Dra. Norma Luiza Würdig e Dra. Carla Ozório, pela estadia de coleta naquele centro.

A minha estadia em Pernambuco só foi possível graças a acolhida da minha amiga Julia Gondra.

A estadia junto ao Laboratório de Acarologia (Depto.de Zoologia e Botânica, IBILCE-UNESP), sob a coordenação do Dr. Reinaldo José Fazzio Feres foi fundamental para o aprendizado de técnicas de coleta e identificação de ácaros terrestres. Devo muito do sucesso dessa visita aos membros desse laboratório, em particular ao Dr. Antonio Carlos Lofego, Msc. Fabio Akashi Hernandez e Msc. Peterson Rodrigo Demite.

Agradeço à Dra. Cristina Anne Rheims, Dr. Alessandro Ponce de Leão Giupponi, Msc. André do Amaral Nogueira e Dra. Renata de Andrade pelo envio de material aracnológico e ajuda na identificação de exemplares.

Expresso aqui a minha profunda gratidão à Dr. Marta Maria Antoniazzi, à Dr. Sylvia Mendes Carneiro e ao Dr. Carlos Jared (Instituto do Butantã, Brasil) que permitiram o uso irrestrito do Laboratório de Biologia Celular, auxiliaram com inúmeras sugestões quanto às técnicas de microscopia eletrônica e enriqueceram a minha vida com uma convivência de uma humanidade rara. Agradeço a todos do Laboratório de Biologia Celular, pelo ambiente de trabalho alegre e solidário que fez passar de forma leve mesmo os momentos difíceis.

Não tenho palavras para expressar o quanto sou grato ao Dr. Fernando Portella de Luna Marques (IBUSP) pela ajuda constante quanto à implementação das análises no cluster de computadores do Departamento de Zoologia, IBUSP. Nem a alegria de ter convivido com pessoas como Maira Concistré, Karin Fehlauer, Sabrina Barone, Denis Jacob Machado, Claudia Olivares, Ezequiel Ale, Max Marona e Silvia Geurgas no Laboratório de Sistemática Molecular.

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Augusto G. de F. Castro Ribeiro (IBUSP) por ter facultado o uso das facilidades do Laboratório de Microscopia Eletrônica durante o período crucial em que o microscópio de transmissão do Instituto Butantã estava em manutenção. Agradeço também aos técnicos Gaspar Ferreira de Lima, Edson Rocha de Oliveira (Departamento de Histologia e Embriologia, ICBUSP), Márcio Valentin Cruz e Waldir Caldeira (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IBUSP), pela ajuda dedicada e sugestões quanto às técnicas de microscopia eletrônica.

À diretoria do CEBIMar-USP por ter facultado o uso das suas instalações e a todos os funcionários do centro. Gostaria de registrar aqui meu reconhecimento aos

técnicos Joseilto Medeiros de Oliveira, Joseph Marie Ettiene Van Sebroeck, Eduardo Honuma, Adriano Collares da Motta e Elso Alves da Silva pela ajuda nas coletas realizadas pelo autor.

Ao Dr. Karl Kjer (Rutgers University, New Jersey), Dr. Leandro Cézane de Souza Assis (IBUSP), Dr. Eduardo Gorab (IBUSP), Dra. Grace Wyngaard (James Madison University, Harrisonburg) e Dra. Janet W. Reid (Virginia Museum of Natural History, Martinsville) pelas preciosas sugestões e críticas quanto ao andamento do trabalho e preparação de manuscritos. Agradeço à Dra. Sylvia Mendes Carneiro e ao Dr. Márcio Bernardino da Silva pela preciosa ajuda quanto a correção da tese.

Aos professores Dr. Pedro Gnaspini Netto e Dr. Antônio Carlos Marques, coordenadores do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zoologia do IBUSP durante o período em que foi desenvolvido este trabalho.

Índice

Capítulo 1.	Introdução geral	01
1.1.	Introdução	01
1.1.1.	Espermatozóides como fonte de informação filogenética	03
1.1.2.	Posição filogenética dos ácaros Acariformes	05
1.1.3.	Justificativa e objetivos	06
1.2.	Metodologia empregada	09
1.2.1.	Esforço amostral e técnicas de coleta	09
1.3.	Referências	18
Capítulo 2.	Posição Filogenética dos ácaros Acariformes	23
2.1.	Introdução	26
2.1.1	Estudos anteriores a respeito da filogenia de Arachnida	27
2.2.	Material e Métodos	34
2.2.1.	Táxons amostrados	34
2.2.2.	Extração, amplificação e sequenciamento	37
2.2.3.	Análises Filogenéticas	38
2.3.	Resultados	48
2.3.1	Características das sequências e da estrutura secundária dos genes amostrados	48
2.3.2.	Análise molecular baseada exclusivamente em homologia estática	52
2.3.3.	Análises combinadas sob homologia estática dos dados morfológicos e moleculares	54
2.3.4.	Análises moleculares integrando as regiões de alinhamento ambíguo	55
2.4.	Discussão	64
2.4.1	Comentários a respeito da metodologia	64
2.4.2.	Posição filogenética dos ácaros Acariformes	74
2.4.3.	Posição filogenética dos Palpigradi, Xiphosura e o problema do monofiletismo de Arachnida	77
2.5.	Referências	80
2.6.	Enunciados dos caracteres constantes da “matriz A”	99

Capítulo 3.	Espermatologia comparada dos Halacaridae	156
3.1.	Introdução	158
3.1.1.	Morfologia funcional dos espermatozóides dos ácaros	
	Actinotrichida	158
3.1.2.	Visão geral do trato reprodutor masculino dos ácaros Halacaridae	
		162
3.2.	Material e métodos	163
3.2.1	Táxons amostrados	163
3.2.2.	Técnicas de microscopia eletrônica de transmissão	165
3.3.	Resultados	165
	Subfamília Copidognathinae Bartsch, 1983	166
	Subfamília Halacarinae Viets, 1927	170
	Gênero <i>Agauopsis</i> Viets, 1927	170
	Gênero <i>Arhodeoporus</i> Newell, 1947	172
	Gênero <i>Halacaroides</i> Bartsch, 1981	174
	Gênero <i>Halacaropsis</i> Bartsch, 1986	176
	Gênero <i>Halacarus</i> Gosse, 1855	178
	Subfamília Halixodinae Viets, 1927	180
	Subfamília Lohmannellinae Viets, 1927	182
	Subfamília Rhombognathinae Viets, 1927	184
	Gênero <i>Isobactrus</i> Newell, 1947	184
	Gênero <i>Rhombognathides</i> Viets, 1927	186
	Gênero <i>Rhombognathus</i> Trouessart, 1888	188
	Subfamília Simognathinae Viets, 1927	190
3.4.	Discussão	191
3.4.1.	Táxons sugeridos pela estrutura dos espermatozóides	199
3.5.	Referências	202
3.6.	Figuras	208
Capítulo 4.	Uma nova espécie de <i>Halacaroides</i> do litoral norte de São Paulo	250
4.1.	Introdução	250
4.2.	Material e Métodos	251
4.2.1.	Espécimes analisados e locais de coleta	251
4.2.2.	Abreviaturas utilizadas	251
4.3.	Descrição	252
4.4.	Discussão	256
4.5.	Referências	257

Capítulo 5. Discussão geral e conclusões	258
5.1. Referências	260
Resumo	262
<i>Abstract</i>	263
Apêndice1	264
Descrição dos anexos eletrônicos	
Apêndice2	265
Pepato, A. R. & Rocha, C. E. F. da 2007. Description of a new species of <i>Rhombognathus</i> (Halacaridae, Acari), its spermiogenesis and spermatozoa. <i>Journal of Natural History</i>, 41(37), 2433 - 2445	

Capítulo 1. Introdução geral

1.1. Introdução

Halacaridae é a única família de ácaros aquáticos a povoar toda a gama de habitats marinhos. Enquanto famílias de ácaros, como Selenoribatidae, Fortuyniidae (Oribatida) e Hyadesiidae (Astigmata), restringem-se à região entre marés, e a pouco diversificada superfamília Pontarachnoidea é encontrada em alguns habitats no infralitoral, os halacarídeos são encontrados desde a região de borrimo de ondas no supralitoral até profundezas abissais. Ambientes aquáticos tão diversos quanto chaminés vulcânicas submarinas (Bartsch, 1996a), manguezais (Bartsch, 2003a; Proches, 2002) e água doce (Bartsch, 1996b) apresentam faunas diversificadas de halacarídeos. Eles também aparecem associados a diversos grupos animais, como esponjas, nemertinos, ouriços-do-mar, quítons, gastrópodes, lagostins de água doce, caranguejos e lagostas (uma revisão dessas associações é encontrada em Pepato *et. al.*, 2005).

Halacaridae inclui mais de mil espécies descritas, distribuídas por 51 gêneros marinhos. Um único gênero, *Copidognathus*, contém um terço de todas as espécies descritas. Por outro lado, onze gêneros são monotípicos (Bartsch, 2004a). Apesar da diversidade e abundância, a literatura referente a Halacaridae restringe-se quase que exclusivamente a trabalhos descritivos. Pouco se investigou sobre a história evolutiva da família, sua morfologia interna e suas relações filogenéticas com outros grupos de ácaros.

Newell (1984) propôs uma origem polifilética, ou ao menos difilética, para Halacaridae. Nesse mesmo artigo, Newell elevou as subfamílias Lohmannellinae, Rhombognathinae e Halacarinae, até então incluídas em Halacaridae, para o nível de

família. Exceto pela posição dos palpos (dorsais nos Lohmannellinae), no entanto, Newell não apresentou evidência morfológica que sustentasse sua hipótese.

Schwoerbel (1986) propôs Hydrovolziidae como grupo-irmão de Halacaridae baseado em informações errôneas quanto à morfologia e ao desenvolvimento daquela família como, por exemplo, a ausência de acetábulos genitais externos e a existência de larvas de vida livre. A inclusão de Hydrovolziidae em Parasintegona (ver, por exemplo, Panesar, 2004) corresponde melhor ao conhecimento atual sobre o grupo.

Harvey (1990) rejeitou a hipótese de polifiletismo proposta por Newell e sustentou que a presença de quatro placas dorsais e as pernas I e II dirigidas para frente enquanto as pernas III e IV são dirigidas para trás constituem sinapomorfias unindo os ácaros tradicionalmente incluídos em Halacaridae. Nesse trabalho, Harvey ainda descreveu duas espécies novas de ácaros de água doce, acomodando-as no gênero *Peza* e na família Pezidae, ambos táxons novos. Pezidae foi incluída na superfamília Halacaroidea, pela semelhança geral da estrutura do gnátossoma com aquela de halacarídeos da subfamília Lohmannellinae, e pela ausência de botrídios. Apesar de considerar Halacaridae *sensu lato* um grupo monofilético, Harvey optou por manter a divisão do grupo nas três famílias propostas por Newell (1984) (ver acima).

Na classificação atualmente mais aceita, Halacaridae e Pezidae compõem a superfamília Halacaroidea, Halacaridae sendo considerada monofilética. Bartsch (1996b), baseada na premissa de que a presença de acetábulos genitais internos nos halacarídeos marinhos é uma característica plesiomórfica compartilhada com os Prostigmata terrestres, propôs um ancestral semi-aquático habitante da região entre marés para os Halacaroidea. Após sofrer uma radiação adaptativa nos oceanos, várias linhagens teriam colonizado a água doce em diferentes eras geológicas (Bartsch, 1996b). No entanto, a existência da família Pezidae como grupo-irmão de Halacaridae

torna possível pensar em um cenário diferente, com um ancestral límnico para os Halacaroida, que depois teriam ocupado o ambiente marinho uma ou mais vezes.

Em propostas de filogenia para os Prostigmata amplamente citadas, como as apresentadas por Krantz (1978), Lindquist (1996) e Norton *et al.* (1993), invariavelmente os Halacaroida aparecem como grupo-irmão dos Bdelloidea. No entanto, como alertam Norton *et al.* (1993), essa posição é adotada mais por tradição que por uma avaliação detalhada da morfologia dessas superfamílias.

Quanto às relações entre os gêneros de Halacaridae, apesar do sistema proposto por Bartsch (1983) e emendado por Abé (1998) permanecer amplamente aceito, a maioria dos especialistas salientam que ele precisa ser revisto (e. g. Bartsch, 2004b). Este sistema é baseado em semelhanças da morfologia externa, e leva claramente a grupos parafiléticos ou polifiléticos. Abé (1998) fez a única tentativa de revisar uma subfamília a partir de uma perspectiva cladística na sua revisão de Rhombognathinae. Porém, ao mesmo tempo em que melhorou a definição dos gêneros desta subfamília e organizou o conhecimento a respeito das espécies nela incluídas, não conseguiu dar suporte adequado à hipótese de monofiletismo do grupo. Bartsch (2003b) usou novos dados de natureza ontogenética para reavaliar e reinterpretar a distribuição dos caracteres na subfamília, não encontrando evidências nem para dar suporte nem para rejeitar o monofiletismo dos Rhombognathinae.

1.1.1. Espermatozóides como fonte de informação filogenética

Os espermatozóides combinam uma série de características que fazem deles células especialmente úteis em estudos comparativos. Sua morfologia é determinada pela biologia reprodutiva dos animais, um fator decisivo na definição de padrões evolutivos e, e em muitos animais, como nos ácaros Acariformes, a série completa de

diferenciação celular pode ser observada em um único macho, permitindo que dúvidas quanto à homologia das estruturas celulares possam ser resolvidas através do estudo da espermiogênese.

Não por acaso, diversos autores têm aproveitado caracteres retirados da morfologia dos espermatozóides para inferências filogenéticas. São exemplos do uso de grande número desses caracteres em estudos filogenéticos, trabalhos com táxons tão diferentes e categorias de abrangência tão distintas quanto decápodes Anomura (Tudge, 1997), Platyhelminthes (Justine, 1991), Polychaeta (Jamielson & Rouse, 1989), anelídeos da família Branchiobdellidae (Cardini, *et al.*, 2000) e os peixes ósseos do gênero *Serranus* (Garcia-Diaz *et al.*, 1999).

Todos os grupos de ácaros a que são atribuídas categorias suprafamiliares tiveram a morfologia de seus espermatozóides descrita, sendo que os resultados desses estudos são congruentes com a divisão dos ácaros nos grandes grupos Anactinotrichida e Actinotrichida (revisões em Alberti, 1991 e Alberti & Coons, 1999). Além disso, a histologia dos testículos e a estrutura dos espermatozóides sugerem que Acari seja difilético, com Acariformes proximamente relacionados a Solifugae. Até o início deste trabalho, porém, apenas duas espécies dentre os halacarídeos tiveram as descrições de seus espermatozóides publicadas: *Thalassarachna basteri* (Johnston, 1836) e *Halacarellus thomasi* (Newell, 1984) (Alberti, 1980; Alberti & Meyer-Rochow, 2002). Dados obtidos por este autor antes do início deste projeto a respeito de duas outras espécies, *Acaromantis vespucioi* Pepato & Tiago, 2004 e *Copidognathus tupinamborum* Pepato & Tiago, 2004 revelaram diferenças relativas a quase todos os aspectos da morfologia dos espermatozóides (*e. g.* presença ou ausência de complexo acrossomal, forma do núcleo, dos espermatozóides maduros, detalhes da espermiogênese e das

secreções acompanhantes), encorajaram uma investigação mais completa deste aspecto da anatomia do grupo

1.1.2. Posição filogenética dos ácaros Acariformes

É a comparação com o grupo externo que permite adicionar a componente temporal a uma filogenia. Isto é, apenas após enraizar uma árvore filogenética é que características compartilhadas podem ser explicadas como novidades evolutivas ou plesiomorfias (Bryant, 2001). A compreensão dos dados morfológicos, no caso focados na morfologia dos espermatozóides da família Halacaridae, sofre grave restrição pela inexistência de uma hipótese confiável a respeito da posição dos ácaros Halacaridae entre os Prostigmata. Por isso, foi incluída a inferência da posição desses ácaros nos Acariformes entre os objetivos iniciais deste trabalho.

Na medida em que o trabalho prosseguia, no entanto, percebeu-se que os marcadores utilizados, os genes ribossomais 18S e 28S, já sequenciados para um grande número de aracnídeos, eram informativos para explorar a posição do grande grupo de ácaros a que estes pertencem, os Acariformes ou Actinotrichida, dentre os demais quelicerados, com a vantagem em relação aos trabalhos anteriores por conter uma amostragem realmente significativa daqueles.

De fato, experimentos com conjuntos reais de dados, como o feito por Wallberg *et al.* (2004), demonstram que a estabilidade das topologias obtidas e o suporte dos nós aumentam significativamente com o aumento do esforço amostral.

Além disso, uma vez que os caracteres moleculares estão limitados a cinco estados indistinguíveis (quatro pares de bases e as inserções/deleções), as análises filogenéticas que empregam dados moleculares estão particularmente sujeitas a sugerir agrupamentos sustentados por homoplasias (atração de ramos longos) (Bergsten, 2005).

A amostragem intensiva influencia o resultado final através do “fracionamento” desses ramos longos, reduzindo a possibilidade de artefatos de análise.

Em análises anteriores empregando marcadores moleculares, os ácaros Actinotrichida são representados por apenas de uma a seis espécies exemplares (Wheeler & Hayashi, 1998, Giribet *et al.*, 2002, Klompen *et al.*, 2007). Isso motivou as análises que deram origem ao primeiro capítulo desta tese.

1.1.3. Justificativa e objetivos

Os ácaros, frequentemente referidos como grupo monofilético, é o grupo mais diversificado e abundante de aracnídeos. Podem constituir o único clado, a que se atribui categoria de ordem, que rivaliza com as ordens de insetos em número de espécies. Compreende aproximadamente 50000 espécies descritas, e de 500.000 a 1 milhão de espécies estimadas (Coddington *et al.*, 2004).

Os ácaros são verdadeiramente ubíquos, ocorrendo em todos os ambientes aquáticos e terrestres. Também constituem importantes pragas agrícolas, vetores de doenças e parasitas.

A determinação da posição filogenética dos ácaros Acariformes-certamente é um avanço significativo no entendimento da evolução dos artrópodes e abre novas perspectivas no estudo desses organismos. Esperamos que a primeira parte dessa tese constitua-se em uma contribuição nesse sentido.

Apesar de seu sucesso em ocupar os oceanos, os halacarídeos são desprovidos de um estágio dispersivo e são relativamente pouco fecundos. Sua diversidade e relativamente alto endemismo, assinalado por Newell (1971), são possíveis consequências deste fato. Outro exemplo é o trabalho de Procheş & Marshal (2002), que verificaram grande congruência entre a distribuição dos halacarídeos e as

províncias biogeográficas marinhas da África do Sul. Entretanto, muitos dos gêneros ou grupos de espécies de ácaros marinhos de vida livre são conhecidos de mais de um oceano (Bartsch, 2004a) ou mesmo são cosmopolitas.

Essas características tornam a família Halacaridae candidata a objeto de estudos de biogeografia histórica. A reconstrução dos eventos de vicariância e dispersão são possíveis se várias filogenias bem sustentadas estão disponíveis para grupos monofiléticos presentes na mesma área geral, permitindo o teste de hipóteses à luz da congruência entre os diversos cladogramas de área, como defendido pelos proponentes da zoogeografia vicariante (e.g. Platnick & Nelson, 1978). A família Halacaridae pode atender a esses requisitos em uma escala global, com gêneros e grupos de espécies amplamente distribuídos e espécies relativamente endêmicas.

No entanto, esse potencial em permitir a proposição de hipóteses biogeográficas precisa superar dois obstáculos. Em primeiro lugar, a diversidade dos halacarídeos está subestimada devido às lacunas no esforço de coleta. Regiões inteiras do mundo permanecem praticamente inexploradas, tal como o Atlântico Sul. Em segundo lugar, hipóteses filogenéticas bem fundamentadas estão faltando, tornando difícil o reconhecimento de grupos monofiléticos.

O estudo da fauna de halacarídeos brasileiros foi retomado após mais de cem anos por este autor em sua iniciação científica, mestrado e artigos publicados ou submetidos. O grande número de espécies e sua abundância atestam a necessidade de aprofundar o conhecimento a respeito do grupo na costa brasileira.

No entanto, mais que acumular novas espécies é fundamental organizar o conhecimento sobre a diversidade do grupo em um sistema baseado em grupos naturais (monofiléticos). A classificação atual dos halacarídeos, baseada na similaridade geral,

com subfamílias mal definidas é um obstáculo à compreensão ou mesmo à detecção de padrões globais de diversidade do grupo.

Mas uma nova sistemática dos halacarídeos, fincada em grupos monofiléticos, esbarra na escassez de caracteres. A quetotaxia do idiossoma, aspecto mais explorado nos estudos comparados entre os Actinotrichida (veja Kethley, 1990), é extremamente simplificada nos Halacaridae. Assim, a inclusão de dados moleculares e morfológicos de outros sistemas de órgãos é passo necessário para se atingir esse objetivo mais geral.

Nos capítulos segundo e terceiro, procuramos contribuir com o preenchimento dessas lacunas, através de um estudo comparativo da morfologia dos espermatozóides e espermatogênese desta família e a descrição de uma espécie nova pertencente ao raro gênero *Halacaroides*.

O desenvolvimento deste trabalho visou a:

- Como objetivo resultante das análises moleculares planejadas inicialmente para a determinação da posição filogenética dos Halacaridae, determinar a posição filogenética dos ácaros Acariformes,
- Descrever os espermatozóides, as secreções acompanhantes e a espermatogênese de ácaros halacarídeos, tendo em vista a obtenção de dados morfológicos úteis ao esclarecimento das relações filogenéticas entre os gêneros do grupo e
- Continuar o inventário da fauna de halacarídeos do estado de São Paulo e mesmo mundial através da coleta e eventualmente identificação e descrição de táxons inéditos bem como do registro de ocorrências;

1.2. Metodologia empregada

As metodologias empregadas na obtenção dos dados morfológicos e moleculares inclusos neste trabalho estão descritas nos respectivos capítulos. A seguir passamos a descrever o trabalho de coleta realizado.

1.2.1. Esforço amostral e técnicas de coleta

Até o início deste trabalho, eram conhecidos para o litoral brasileiro halacarídeos pertencentes aos gêneros *Acarochelopodia* (Acarochelopodinae); *Acaromantis* e *Simognathus* (Simognathinae); *Copidognathus* (Copidognathinae); *Agauopsis*, *Atelopsalis* e *Halacarus* (Halacarinae); *Rhombognathus* (Rhombognathinae); *Scaptognathides* e *Scaptognathus* (Lohmanellinae). Destes, apenas os gêneros *Acaromantis*, *Copidognathus*, *Agauopsis*, *Halacarus* e *Rhombognathus* possuíam machos conhecidos, já que é comum entre os halacarídeos um forte desvio na razão sexual favorecendo as fêmeas (Pepato & Tiago, 2003, 2004a,b; 2005a,b; Pepato, *et al.*, 2005; Pepato & Rocha, 2007; dados não publicados).

Através de coletas em lugares ainda pouco estudados, foi possível adicionar os gêneros *Acarothrix* e *Halacaroides* à fauna brasileira, sendo que a espécie referente a esse último é descrita no Capítulo 4. Com o concurso de dois períodos de coleta na Europa e uma visita curta ao Chile, foi possível a obtenção de representantes dos gêneros *Agaue*, *Arhodeoporus*, *Halacaropsis*, *Isobactrus*, *Lohmannella* e *Rhombognathides*. Os dados de coleta estão sumarizados na Tabela I.

Apesar de corresponderem a aproximadamente 24 % dos gêneros marinhos conhecidos, eles incluem em torno de 65 % (Bartsch, 2009) de todas as espécies conhecidas de halacarídeos e estão distribuídos em sete das subfamílias referidas por Abe (1998).

Sequências de 32 Actinotrichida habitantes dos mais diversos ambientes foram obtidas. Além disso, incluiu-se um Palpigradi, um Amplypygi e três aranhas, já que essas ordens estão pobremente representadas no GenBank, donde foram obtidas todas as sequências para as outras ordens de aracnídeos. Os dados de coleta para as espécies empregadas nas análises moleculares estão sumarizadas na Tabela I.

Apenas coletas qualitativas foram feitas. No caso dos ácaros da família Halacaridae e para os ácaros de água doce, frondes de algas, colônias de animais sésseis e cascalho foram lavados, separadamente, sobre peneira com malha de 50 μ m. Amostras de areia de praia foram vigorosamente agitadas em balde com água do mar e o sobrenadante filtrado através de peneira de mesmo tamanho de poro de malha.

Para ácaros terrestres o exame do substrato sob o microscópio estereoscópico provou-se o mais eficaz, já que extratores, como o extrator de Winkler, não garantiram material de boa qualidade para a posterior extração de DNA. Foram examinados folhiço (previamente peneirado), troncos secos, folhas vivas e mesmo vertebrados e insetos que pudessem hospedar ácaros.

Os ácaros foram triados vivos. Parte dos indivíduos foi fixada em álcool a 70%, e eventualmente clarificados com ácido láctico e montados em meio de gelatina-glicerina para serem aproveitados como material testemunho e para identificação. Eles serão oportunamente depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Tabela I. Dados de coleta para as espécies estudadas.

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
Chelicerata					
Ordem Amblypygi					
<i>Charinus Montanus</i>	Município de Santa Teresa, ES, Brasil	19° 55'S, 40° 35'W	Não fornecido pelo coletor	Não fornecido pelo coletor	A. Giupponi
Ordem Araneae					
Corinnidae	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	20. X. 2008	Solo, em barranco	A. Pepato
Tetragnathidae	Campus da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha	42° 59'N, 7° 33'W	18. VIII. 2008	Serapilheira	A. Pepato
Pholcidae	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	20. X. 2008	Ambiente antrópico	A. Pepato
Ordem Palpigradi					
<i>Eukoenennia</i> sp.	Mina Várzea do Lopes Itabirito, MG, Brasil	20° 25'S, 43° 55'W	18-25. IV 2007	Solo de caverna	R. Andrade
Ordem Actinotrichida					
Oribatida					
<i>Pseudotocepheus septemtuberculata</i> Balogh & Mahunka, 1978	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	02. IX. 2007	Serapilheira	A. Pepato
<i>Rostrozetes ovulum</i> (Berlese, 1908)	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	02. IX. 2007	Serapilheira	A. Pepato

Tabela I. *Continuação.*

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
<i>Afronothrus</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	02. IX. 2007	Serapilheira	A. Pepato
<i>Aeroppia</i> sp.	Fragmento florestal, Nova Granada, SP, Brasil	20° 32'S, 49° 14'W	23.V.2007	Sobre vegetação	A. Pepato
<i>Schusteria littoria</i> Grandjean, 1968	Mangue do Araçá, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23° 48'S, 45° 24'W	25 II 2008	Sobre algas verdes	A. Pepato
Astigmata					
<i>Sancassania</i> sp	Instituto Butantã, São Paulo Brasil	23° 34'S, 46° 43'W	05. X. 2007	<i>Gymnophiona</i> em cativeiro	A. Pepato
<i>Rhizoglyphus</i> sp.	Carajás, Pará, Brazil	2° 56'S, 51° 51'W	23. VIII- 02. IX. 2007	Solo de caverna	R. Andrade
“Endeostigmata”					
<i>Bimichaelia</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	03. IX. 2007	Serapilheira	A. Pepato
Prostigmata Bdellidae					
<i>Bdellodes</i> sp.	Mina de Congo Soco, Barão de Cocais, MG, Brasil	19° 56'S, 43° 28'W	22-24. XI. 1997	Solo de caverna	R. Andrade
<i>Spinibdella</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	06. X. 2008	Musgo	A. Pepato

Tabela I. *Continuação.*

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
Rhagidiidae					
<i>Poecilophysis</i> sp.	Campus da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha	42° 59'N, 7° 33'W	18. VIII. 2008	Serapilheira	A. Pepato
Rhagidiidae sp.	Mina Várzea do Lopes Itabirito, MG, Brasil	20° 25'S, 43° 55'W	18-25. IV. 07	Solo de caverna	R. Andrade
Eupodidae					
<i>Eupodes</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	06. X. 2008	Musgo	A. Pepato
Paratydeidae					
<i>Scolotydaeus corticicola</i> Flechtmann, 1992	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	20. X. 2008	Tronco ressecado	A. Pepato
Tenuipalpidae					
<i>Tenuipalpus heveae</i> Baker, 1945	Laboratório de Acarologia-IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil	20° 47'S, 49° 21'W	23.V.2007	Material mantido em cultura.	R. Feres.
Tetranychidae					
<i>Tetranychus</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	22. IX. 2007	Sobre pé de mamão	A. Pepato
<i>Sonotetranychus</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	15. IX. 2008	Sobre vegetação	A. Pepato

Tabela I. *Continuação.* *, A taxonomia da família Trombiculidae é baseada principalmente nas larvas. Uma larva associada aos indivíduos adultos coletados pertence ao gênero *Hoffmaniella*, mas sem o estudo completo do desenvolvimento é impossível assinalar os espécimes ao gênero com certeza.

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
Cheyletidae					
<i>Oudemansicheyla</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	15. IX. 2008	Sobre vegetação	A. Pepato
<i>Cheletomimus (Hemicheyletia) wellsi</i> (Baker, 1949a)	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	15. IX. 2008	Sobre vegetação	A. Pepato
Stigmaeidae					
<i>Agistemus</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	06. X. 2008	Musgo	A. Pepato
Anystidae					
<i>Erythracarus</i> sp.	Mina de Congo Soco, Barão de Cocais – MG	19° 56'S, 43° 28'W	22-24. XI. 1997	Solo de caverna	R. Andrade
<i>Anystis</i> sp.	Campus da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha	42° 59'N, 7° 33'W	18. VIII. 2008	Serapilheira	A. Pepato
Trombiculidae					
<i>Hoffmaniella</i> * (?)	Praia do Segredo, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23° 49'S, 45° 25'W	21.III. 2007	Algas no costão rochoso	A. Pepato
Microtrombidiidae					
<i>Microtrombidium</i> sp	Mina Várzea do Lopes Itabirito, MG, Brasil	20° 25'S, 43° 55'W	18-25. IV. 07	Solo de caverna	R. Andrade

Tabela I. *Continuação.*

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
Smaridiidae					
<i>Smaridiidae</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	22. IX. 2008	Serapilheira	A. Pepato
Erythraeidae					
<i>Leptus</i> sp.	Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil	23° 34'S, 64° 44'W	05. IX. 2007	Sobre rocha	A. Pepato
Arrenuridae					
<i>Arrenurus</i> sp.	Rio Tramandaí, Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil	29° 58'S, 50° 09'W	04. X. 2006	Plantas aquáticas	A. Pepato
Hydrachnidae					
<i>Hydrachna</i> sp.	Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP, Brasil	23° 29'S, 46° 31'W	05. III. 2007	Parasitando hemiptera aquático.	A. Pepato
Unionicolidae					
<i>Recifella</i> sp.	Rio Ribeira do Iguape, Iguape, São Paulo, Brasil	24° 39'S, 46° 31'W	17.IV.2007	Plantas aquáticas	A. Pepato
Limnesiidae					
<i>Limnesia</i> sp.	Represa Billings, São Paulo, SP, Brasil	23° 49'S, 46° 37'W	18. II. 2008	Plantas aquáticas	A. Pepato

Tabela I. *Continuação.*

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
Halacaridae					
Copidognathinae					
<i>Acarothrix</i> sp.	Rio Tramandaí, Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil	29° 58'S 50° 08'W	2. X. 2006	Algas verdes	A. Pepato
<i>Copidognathus</i> sp.	Ilhota de Itassucê, São Sebastião, SP, Brasil.	23° 50'S 45° 26'W	08. IX. 2005	Cascalho conchífero	A. Pepato
<i>Copidognathus brachystomus</i> Viets, 1940	Heiligenhafen, Mar Báltico, Alemanha	54° 23'N 11° 07'E	2. IX. 2006	Algas, atracadouro	I. Bartsch & A. Pepato
<i>Copidognathus floridensis</i> (Newell, 1947)	Praia das Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23° 49'S 45° 25'W	18. IV. 2005	Algas, costão rochoso	A. Pepato
<i>Copidognathus tupinamborum</i> Pepato & Tiago, 2005	Praia das Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23° 49'S 45° 25'W	18. IV. 2005	Algas, costão rochoso	A. Pepato
Halacarinae					
<i>Agauopsis</i> sp (grupo <i>brevipalpus</i>)	Mangue de Maracaípe, Ipojuca, PE, Brasil	8° 32'S 35° 00'W	07. VIII. 2007	Sobre talos de <i>Bostrychia</i> sp.	A. Pepato
<i>Arhodeoporus gracilipes</i> (Trouessart, 1889)	Aguiño, Galícia, Espanha	42° 31'N 09° 01'W	03. VI. 2008	Sobre <i>Padina pavonica</i>	C. Besteiro & A. Pepato
<i>Halacaroides</i> sp. nov	Praia das Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23° 49'S 45° 25'W	12. IV. 2006	Areia grosseira sob influência de água doce	A. Pepato

Tabela I. *Continuação.*

Táxon	Localidade de coleta	Coordenadas	Data	Substrato	Coletor
<i>Halacaropsis hirsuta</i> (Trouessart, 1889)	Praia de Vidrieiro, O Barqueiro, Galícia, Espanha.	43° 44'N 7° 40'W	07. VI. 2008	Algas calcarias.	C. Besteiro & A. Pepato
<i>Halacarus actenos</i> Trouessart, 1889	Praia de Vidrieiro, O Barqueiro, Galícia, Espanha.	43° 44'N 7° 40'W	07. VI. 2008	Algas calcarias.	C. Besteiro & A. Pepato
Halixodinae					
<i>Agaue panopae</i> (Lohmann, 1893)	Ponta de Segão, Ría de Ferrol, Galícia, Espanha.	43° 27'N 8° 19'W	06. V. 2008	Algas, região entre - marés.	C. Besteiro & A. Pepato
Lohmannellinae					
<i>Lohmannella rectangulops</i> Newell, 1984	Praia Torpederas, Valparaíso, Chile	33° 01'S 71° 38'W	01. XI. 2007	Seixos, areia grosseira.	A. Pepato
Rhombognathinae					
<i>Isobactrus uniscutatus</i> (Viets, 1939)	Rio Elba, próx. a Twielenfleth, Hamburgo, Alemanha	53° 36'N 9° 33'E	13. 08. 2006	Algas ribeirinhas.	I. Bartsch
<i>Rhombognathides seahami</i> (Hodge, 1860)	Praia de Camelle, Camelle, Galícia, Espanha.	43° 11'N 9° 05'W	04. V. 2008	Algas junto à Laminaria.	C. Besteiro & A. Pepato
<i>Rhombognathus levigatoides</i> (Pepato & Rocha, 2007)	Praia das Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, Brasil.	23° 49'S 45° 25'W	07. XI. 2006	Costão rochoso, sobre algas	A. Pepato
Simognathinae					
<i>Acaromantis vespucioi</i> Pepato & Tiago, 2004	Praia das Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, Brasil.	23° 49'S 45° 25'W	12. IV. 2006	Areia grosseira	A. Pepato

1.3. Referências

- Abe, H. 1998. Rhombognathine Mites: Taxonomy, Phylogeny, and Biogeography. Hokkaido University Press, Sapporo, 228pp.
- Alberti, G. 1980. Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiocytenogenese der Milben (Acari). II. Actinotrichida. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 104, 144–203.
- Alberti, G. 1991. Spermatology in the Acari: systematic and functional implications. In: Schuster, R., Murphy, P. W. *The Acari: Reproduction, Development and Life-History Strategies*. Chapman and Hall, London, p.77–105.
- Alberti, G. & Coons, L. B. 1999. Acari mites. In: Harrison, F. W. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 8C. Wiley-Liss, New York, 515-1265.
- Alberti, G. & Meyer-Rochow, V. B. 2002. Ultrastructural investigations of testes and spermiogenesis in two species of halacarid mites (Halacaridae, Actinedida, Actinotrichida): *Thalassarachna basteri* from the Baltic Sea and *Halacarellus thomasi* McMurdo Sound (Antarctica). *Arthropod Structure and Development*, 30, 315–328.
- Bartsch, I. 1983. Vorschlag zur Neugliederung des Systems der Halacaridae (Acari). *Zoologische Jahrbuecher Abteilung für Systematik, Oekologie und Geographie der Tiere*, 110(2), 179-200.
- Bartsch, I. 1996a. Halacarid mites (Acari) from the Mid-Atlantic ridge. New records. *Cahiers de Biologie Marine*, 37, 159-167.
- Bartsch, I. 1996b. Halacarids (Halacaroidea, Acari) in freshwater. Multiple invasions from the Paleozoic onwards. *Journal of Natural History* 30, 67-99.

- Bartsch, I. 2003a. Mangrove halacarid fauna (Halacaridae, Acari) of the Dampier region, Western Australia, with description of five new species. *Journal of Natural History* 37, 1855-1877.
- Bartsch, I. 2003b. The subfamily Rhombognathinae: Developmental pattern and re-evaluation of the phylogeny (Arachnida, Acari, Halacaridae). *Senckenbergiana Biologica*, 82, 15-57.
- Bartsch, I. 2004a. Geographical and ecological distribution of marine halacarid genera and species (Acari: Halacaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 34, 37–58
- Bartsch, I. 2004b. Description of species of the genera *Actacarus* and *Scaptognathides* (Acari: Halacaridae). *Zootaxa*, 755, 1-8.
- Bartsch, I. 2009. Checklist of marine and freshwater halacarid mite genera and species (Halacaridae: Acari) with notes on synonyms, habitats, distribution and descriptions of the taxa. *Zootaxa*, 1998, 1-170.
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21, 163-193
- Bryant, H. N. 2001. Character polarity and the rooting of cladograms. In: Wagner, G. P. *The character concept in evolutionary biology*. Academic Press, New York. 319-338.
- Cardini, A., Ferraguti, M. & Gelder, S. R. 2000. A phylogenetic assessment of the branchiobdellidan family Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using spermatological and somatic characters. *Zoologica Scripta*, 29(4), 347–366.
- Coddington, J. A., Giribet, G., Harvey, M. S., Prendini, L., & Walter, D. E. 2004. Arachnida. *Assembling the Tree of Life*. In: Cracraft, J. & Donoghue, M. J. Oxford University Press, Oxford, 281-295.
- Garcia-Diaz, M. M., Lorente, M. J., Gonzalez, J. A. & Tuset, V. M. 1999. Comparative ultrastructure of spermatozoa of three marine teleosts of the genus *Serranus*:

- Serranus atricauda*, *Serranus cabrilla* and *Serranus scriba*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 31, 503-508.
- Giribet, G., Edgecombe, G. D., Wheeler, W. C. & Babbitt, C. 2002. Phylogeny and systematic position of Opiliones: a combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics*, 18, 5-70.
- Harvey, M. S. 1990. Pezidae, a new freshwater mite family from Australia (Acarina: Halacaroida). *Invertebrate Taxonomy*, 3, 771-778.
- Jamielson, B. G. M. & Rouse, G. W. 1989. The spermatozoa of the Polychaeta (Annelida): an ultrastructural review. *Biological Review*, 64, 93-157.
- Justine, J. L. 1991. Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 1421-1440.
- Kethley, J. 1990. Acarina: Prostigmata (Actinedida). In D. L. Dindal. *Soil Biology Guide*. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 667-756.
- Klompen, H., Lekveishvili, M. & Black, W.C., IV. 2007. Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43, 936-951.
- Krantz, G.W. 1978. A Manual of Acarology. 2nd Edition. Oregon State University Bookstores, Corvallis, 509 pp.
- Lindquist, E.E. 1996. Phylogenetic relationships. In: *Eriophyoid mites - their biology, natural enemies and control*. In: Lindquist, E., E. Sabelis, M. W. & J. Bruin Elsevier Science, Amsterdam, 301-327.
- Newell, I.M. (1971) Halacaridae (Acari) collected during cruise 17 of the R/V Anton Bruun, in the southeastern Pacific Ocean. *Anton Bruun Report*, 8, 1-58.

- Norton, R.A., J.B. Kethley, D.E. Johnston, & B.M. OConnor. 1993. Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: Wrensch, D. L. & Ebbert, M. *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman & Hall, New York, 8-99
- Panesar, A. R. 2004. A revision of the Anisitsiellidae. *Bonner Zoologische Monographien*. 52, i, 1-144.
- Pepato, A. R. & Rocha, C. E. F. da 2007. Description of a new species of *Rhombognathus* (Halacaridae, Acari), its spermiogenesis and spermatozoa. *Journal of Natural History*, 41, 2433 - 2445
- Pepato, A. R. & Tiago, C. G. 2003. A new species of *Agauopsis* (Halacaridae, Acari) from Brazil. *Cahiers de Biologie Marine*, 44, 369-373.
- Pepato, A. R. & Tiago, C. G. 2004a. The genera *Acaromantis* and *Simognathus* (Simognathinae, Halacaridae) on the north coast of São Paulo State, Brazil. *Zootaxa*, 615, 1-16.
- Pepato, A. R. & Tiago, C. G. 2004b. *Atelopsalis atlantica* nov. sp., a new species of halacarid mites from south eastern Brazilian coast. *Revista Ibérica de Aracnologia*, 10, 145-148.
- Pepato, A. R. & Tiago, C. G. 2005a Two new species of *Agauopsis* (Halacaridae, Acari) from Southeastern Brazil. *Zootaxa*, 994, 1-12.
- Pepato, A. R. & Tiago, C. G. 2005b. New species and new occurrences of *Copidognathus* (Acari, Halacaridae) from the northern littoral zone of São Paulo State (Brazil). *Zootaxa*, 1083, 1-35
- Pepato, A. R.; Santos, C. & Tiago, C. G. 2005. Two new closely related species of *Copidognathus* (Acari, Halacaridae) associated with crabs. *Cahiers de Biologie Marine*, 46 (1), 69-79.

- Platnick, N. I. & G. Nelson 1978. A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology*, 27, 1-16.
- Procheş, Ş. 2002. New species of Copidognathinae (Acari: Halacaridae) from southern Africa. *Journal of Natural History*, 36, 999–1007.
- Procheş, Ş. & Marshall, D. J. 2002. Diversity and biogeography of southern African intertidal Acari. *Journal of Biogeography*, 29, 1201-1215.
- Schwoerbel, J. 1986. Acari: Limnohalacaridae and Hydrovolziidae. In: Botosaneanu, L. *Stygofauna mundi: a faunistic, distributional, and ecological synthesis of the world fauna inhabiting subterranean waters (including the marine interstitial)* Brill Academic Pub, Leiden, 643-644.
- Tudge, C. C. 1997. Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): Spermatozoa and spermatophore morphological evidence. *Contributions to Zoology*, 67, 125-141.
- Wallberg, A., Thollessen, M., Farris, J. S. & Jondelius, U. 2004. The phylogenetic position of the comb jellies (Ctenophora) and the importance of taxonomic sampling. *Cladistics* 20, 558-578.
- Wheeler, W. C. & Hayashi, C. Y. 1998. The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics*, 14, 173–192.

Capítulo2. A posição filogenética dos ácaros Actinotrichida dentre as ordens viventes de quelicerados

---

Abstract

The phylogenetic position of Acariformes mites is examined employing SSU, partial LSU sequences, and morphology of 91 extant terminals. In a static homology framework, molecular sequences were aligned using the secondary structure as guide, regions of ambiguous alignment were discarded, and pre-aligned sequences analyzed under parsimony and different mixed models in a Bayesian inference. Parsimony and Bayesian analysis led to trees largely congruent concerning infra-ordinal well-supported branches, but with low support for inter-ordinal relationships. Exception is Solifugae + Actinotrichida (P. P. = 100%, Jackknife = 0.68). In a dynamic homology framework, two analyses were run: a standard POY analysis and an analysis constrained by the secondary structure. Both analyses led to largely congruent trees, supporting a (Palpigradi (Solifugae Acariformes)) clade and Ricinulei as sister group of Tetrapulmonata with the topology (Ricinulei (Amblypygi (Uropygi Araneae))). Combined analysis with two different morphological data matrices were run for evaluating the impact on recovered topology of constraining the analysis employing secondary structure as a guide for homology establishment. The constrained combined analysis yielded to topologies similar to the exclusively molecular analysis for both morphological matrices, except for the recovery of Pedilpalpi instead of the (Uropygi Araneae) clade. The standard (direct optimization) POY analysis, however, led to the recovery of trees differing in the absence of otherwise well-supported group Solifugae + Acariformes. Previous articles combining ribosomal sequences and morphology recovered topologies similar to the morphological analysis for Chelicerata. The seeming

stability of certain clades not recovered here, like Haplocnemata and Acari, are regarded as the byproduct of the way as molecular homology was established by the instrumentalist approach implemented in POY. The constraining of the analysis by *a priori* homology assessment is defended here as a way of keeping the severity of the test when adding new data to analysis. Although the strength of the method advocated here is keeping phylogenetic information from regions usually discarded in an exclusively static homology framework, it still has the inconvenient of being uninformative on the effect of alignment ambiguity on clade support. Finally, putative morphological apomorphies of Solifugae + Acariformes are the reduction of the proximal chelicerae podomere, medial abutting of leg coxae, loss of sperm nuclear membrane, and presence of differentiated germinative and secretory regions delivering their products to a common lumen.

Resumo

A posição filogenética dos ácaros Acariformes é examinada empregando-se os genes ribossomais 18S, 28S e a morfologia de 91 espécies de quelicerados. No marco das análises aplicando apenas homologia estática, as sequências foram alinhadas utilizando-se a estrutura secundária como guia; as regiões de alinhamento ambíguo detectadas foram descartadas. As regiões restantes foram analisadas utilizando-se análises de parcimônia e bayesiana, a última sob diferentes modelos mistos. As duas análises levaram a árvores congruentes em relação à maioria dos ramos bem suportados, mas com baixo suporte para as relações inter-ordinais. Uma exceção é Solifugae + Actinotrichida (P. P. = 100%, Jackknife = 0.68). Duas análises foram feitas empregando-se otimização direta. A primeira, uma análise padrão utilizando POY, e a segunda constrangida pela informação obtida graças à estrutura secundária, na qual a

otimização direta foi aplicada apenas às regiões detectadas como de alinhamento ambíguo. As duas análises levaram a árvores largamente congruentes, suportando um clado com a topologia (Palpigradi (Solifugae Acariformes)) e outro com Ricinulei como grupo-irmão de Tetrapulmonata, com a topologia (Ricinulei (Amblypygi (Uropygi Araneae))). Análises combinadas foram feitas empregando-se duas matrizes morfológicas diferentes, a fim de testar o efeito de constranger a análise ao se utilizar a estrutura secundária na topologia recuperada. O resultado foi que as análises combinadas baseadas em sequências parcialmente alinhadas levaram a topologias idênticas, quanto às relações interordinais, e muito similares à dos dados exclusivamente moleculares, exceto pela presença de Pedipalpi, ao invés do clado (Uropygi Araneae). As análises utilizando apenas otimização direta, no entanto, diferiram no táxon de outra forma bem suportado Solifugae + Acariformes. Trabalhos anteriores combinando sequências ribossomais e morfologia recuperaram topologias semelhantes às de análises exclusivamente morfológicas para os quelicerados. Essa aparente estabilidade de certos clados não recuperados nas análises apresentadas aqui, como Haplocnemata e Acari, é considerada como um efeito da forma como a homologia dos caracteres moleculares foi estabelecida pela abordagem instrumentalista implementada no POY. O passo preliminar em que as sequências são parcialmente alinhadas é defendido como forma de manter a severidade do teste por congruência das hipóteses filogenéticas quando adicionados dados moleculares à análise. Apesar de esse procedimento ser defendido aqui como forma de manter a informação filogenética das regiões usualmente descartadas no quadro de uma análise baseada exclusivamente em caracteres estáticos, continua ignorando o possível efeito da incerteza do alinhamento sobre o suporte dos clados. Finalmente, são prováveis apomorfias morfológicas ligando Solifugae + Acariformes a redução do artículo proximal da quelícera, a união medial

das coxas, a perda da carioteca nos espermatozóides e a presença da diferenciação, nos testículos, de uma região germinativa e outra secretora.

2.1 Introdução

A ordem Acari (ácaros e carrapatos) tem sido tratada na literatura desde como uma única ordem até como uma superordem com sete ordens (Evans, 1992). Juntas correspondem a aproximadamente metade do total das espécies descritas de aracnídeos (Harvey, 2002). Duas linhagens principais são tradicionalmente reconhecidas: Actinotrichida (ou Acariformes) e Anactinotrichida (ou Parasitiformes). Apesar de Opiloacariformes terem sido considerados como uma linhagem distinta (Halliday, 1998), a sua morfologia interna e externa os liga claramente aos Parasitiformes (Alberti, 2006; Dunlop & Alberti, 2007).

Das duas principais linhagens, Acariformes é a mais diversificada e compreende aproximadamente dois terços de todas as espécies conhecidas de ácaros (Harvey, 2002). Também é o grupo mais antigo, incluindo representantes das duas primeiras comunidades de invertebrados terrestres conhecidas, a da Formação Gilboa (Estado de Nova York, EUA) e Rhynie Chert (Escócia), do Devoniano médio e inferior, respectivamente. Em contraste, os Parasitiformes aparecem no registro fóssil apenas na era mesozóica (Dunlop *et al.*, 2008), e são escassamente representados no registro fóssil. Entre as espécies viventes de Acariformes, uma impressionante diversidade de estilos de vida e habitats tem sido documentada. Além do que, o grupo inclui pragas agrícolas, parasitas e vetores de doenças vegetais e animais de grande significado prático.

Masta *et al.* (2008) explorou o uso do genoma mitocondrial para inferir as relações entre as ordens de aracnídeos, mas pôde incluir dados de apenas seis das 12

ordens viventes. No entanto, trabalhos anteriores que exploraram as relações filogenéticas entre as ordens de quelicerados incluindo dados de todas as ordens empregaram, como marcadores moleculares, os genes ribossomais nucleares 18S e 28S (Wheeler & Hayashi, 1998, Giribet *et al.* 2002, Klompen *et al.* 2007). Nesse caso, o número de ácaros Acariformes variou de um a seis.

Durante a pesquisa pela posição filogenética dos Halacaridae dentre os ácaros Actinotrichida, percebeu-se que a inclusão de muitas sequências novas de genes ribossomais de Acariformes levava a importantes mudanças na topologia recuperada, ainda que lançando mão dos mesmos marcadores de estudos anteriores. De fato, apesar de que a inclusão de novos marcadores seja um objetivo premente para a resolução da filogenia do grupo, não se deve ignorar que os ácaros Actinotrichida foram sub-representados nas análises anteriores, o que motivou o presente estudo.

2.1.1 Estudos anteriores a respeito da filogenia de Arachnida

Weygoldt & Paulus (1979) empregaram pela primeira vez o método de Willi Hennig para abordar a filogenia dos aracnídeos (Fig. 1 A) e sugeriram os ácaros como grupo-irmão de Ricinulei. Eles, no entanto, não testaram a monofilia dos ácaros, desde que empregaram a abordagem de codificar os estados considerados por eles como ancestrais da “ordem”, ao invés de levar em conta os polimorfismos encontrados dentro do grupo.

Fig. 1. Hipóteses prévias de relações filogenéticas entre as ordens de quelicerados. A- Weygoldt & Paulus (1979). B- Shultz (1990). C- Van der Hammen (1977); nesse caso, um dendograma não baseado em uma análise cladística (enraizado pelos autores). D- Shultz (2007a); inferência combinando dados paleontológicos e neontológicos.

Lindquist (1984) endossou a noção de monofiletismo dos ácaros propondo onze possíveis sinapomorfias para o clado. No entanto, a maioria delas é ácaro-específica, isto é, referem-se a características não estudadas em outras ordens, são “tendências

evolutivas” ou relacionadas à redução de tamanho (Dunlop & Alberti, 2007). Presença de um gnatossoma, i.e., um pseudotagma que inclui as partes bucais, formado principalmente pela fusão das coxas do palpo, e a presença de uma larva hexápode, são as possíveis sinapomorfias aceitas e empregadas nas análises cladísticas posteriores sustentando Acari e Ricinulei como grupos-irmãos.

Van der Hammen (1977, 1989) considerou a presença de gnatossoma em Acari e Ricinulei como não homólogos baseado em detalhes de sua musculatura. Os ácaros foram considerados difiléticos, com Acariformes como grupo-irmão de Palpigradi (Epimerata) e Anactinothrichida como grupo-irmão de Ricinulei (Cryptognomae) (Fig. 1C). Apesar de Van der Hammen ter feito uma extensa pesquisa a respeito da morfologia dos ácaros e aracnídeos, sua insistência em rejeitar o método cladístico e o controverso cenário que defende para a evolução da coxa em suporte a Epimerata, diminui consideravelmente o impacto posterior de suas conclusões.

A análise filogenética apresentada por Shultz (1990, Fig. 1 B) novamente levou à obtenção dos ácaros como grupo-irmão de Ricinulei. Esse táxon foi formalmente chamado Acaromorpha, apesar desse nome ter sido cunhado originalmente por Dubinin (1957), referindo-se apenas às linhagens de ácaros. Shultz (1990) realizou suas análises depois de uma pesquisa extensa da morfologia apendicular de todas as ordens de aracnídeos, mas repetiu a codificação por táxons supra-específicos, da mesma forma que Weygoldt & Paulus (1979). Assim, novamente, o monofiletismo de Acari não foi posto a prova.

Fig. 2. A-C, Wheeler & Hayashi (1998). A- Hipótese baseada na análise dos dados morfológicos apenas. B- Hipótese baseada na análise dos dados moleculares (parcial 18S e 28S), empregando otimização direta como implementada no programa POY (inserções/deleções, transversões e transições recebendo o mesmo peso: regime de custos, 1:1:1). C- Análise combinada (regime de custo para os dados moleculares, 2:1:1). **D-F, Giribet et al. (2002),** dados moleculares analisados através da otimização direta (regime de custos, 2:2:1). D- Análise baseada apenas nos dados moleculares. E- Análise combinada incluindo apenas terminais viventes. F- Análise combinada incluindo terminais viventes e extintos.

A noção de Acari como um grupo monofilético e a sua inclusão em Acaromorpha *sensu* Shultz (1990) recebeu crescente aceitação tanto entre acarólogos como entre aracnólogos. No entanto, deve-se fazer notar que nenhuma nova evidência, em termos de sinapomorfias explícitas, foi descoberta em suporte a essa hipótese desde o sumário de Lindquist (1984).

Wheeler & Hayashi (1998) analisaram sequências parciais dos genes 18S e 28S de espécies pertencentes a todas as ordens de aracnídeos, exceto Palpigradi, e recuperaram os ácaros como difiléticos em suas análises exclusivamente moleculares. Enquanto a única espécie de Actinotrichida inclusa, *Tetranychus urticae*, tenha sido recuperada em uma improvável posição na base do cladograma, fora mesmo de Chelicerata (Fig. 2 A), Anactinothrichida emergiu dessa análise como grupo-irmão de Pycnogonida. Deve-se, no entanto, ter em mente que essa deve ser considerada uma primeira tentativa, com uma amostragem insuficiente. Quando combinado com dados morfológicos, um cladograma similar àquele gerado por Shultz (1990), trabalho com o qual a maior parte dos caracteres morfológicos é compartilhada (Fig. 2B), foi obtido. O resultado da análise de evidência total diferiu apenas pela posição da ordem Amblypygi, recuperada como grupo-irmão das aranhas (Fig. 2C).

Acaromorpha *sensu* Shultz foi desafiada por dados novos oriundos da paleontologia e ultra-estrutura. Dunlop (1996) apresentou uma série de possíveis apomorfias ligando os Ricinulei à ordem fóssil Trigonotarbida, a que se adicionou as descobertas recentes a respeito da morfologia do palpo (Dunlop *et al.*, 2009). Isto implicaria que os gnatossomas de Ricinulei e Acari seriam convergentes, já que Trigonotarbida apresenta as coxas dos palpos livres. Mais que isso, sugere que os Ricinulei seriam mais proximamente relacionados aos Tetrapulmonata viventes que às outras ordens de aracnídeos, pois Trigonotarbida apresenta pulmões foliares nos

segmentos segundo e terceiro do opistossoma. Um cenário similar já havia sido proposto por Van der Hammen (1979).

Alberti & Peretti (2002) confirmaram observações prévias a respeito dos espermatozoides da ordem Solifugae (ausência de carioteca no espermatozoide maduro) e na estrutura fina dos testículos (diferenciação em uma região germinativa e outra secretora, com um lúmen que recebe os produtos das duas regiões). Eles argumentaram que essas observações deveriam ser consideradas como possíveis apomorfias compartilhadas por Solifugae e Acariformes, contradizendo dois táxons recuperados na maioria das análises filogenéticas, Haplocnemata (Solifugae e Pseudoscorpiones) e Acari.

Giribet *et al.* (2002) empregaram amostragem superior à de Wheeler and Hayashi (1998) tanto no número de terminais quanto no número de nucleotídeos. Além disso, eles empregaram pela primeira vez a abordagem de codificar os estados dos caracteres para cada uma das espécies, de forma a refletir na matriz morfológica os polimorfismos intra-ordinais e permitindo testar o monofiletismo das ordens. (veja Prendini (2001) para detalhes a respeito dessa abordagem e suas vantagens). Nas análises moleculares, ácaros aparecem novamente como difiléticos, com Acariformes em uma posição basal e Anactinothrichida recuperado como grupo-irmão de Pseudoscorpiones (Fig. 2 C). A análise combinada dos dados neontológicos recuperou Acari, mas em uma posição basal, distante de Ricinulei. Ao adicionar os táxons fósseis, enraizando a árvore em Trilobita, Ricinulei formou um clado com a ordem fóssil Trigonotarbita, os dois como grupo-irmão de Tetrapulmonata. Nesta última análise, Acari aparece como grupo-irmão de Pycnogonida (Fig. 2 D). Note-se, no entanto que, na verdade, as árvores exclusivamente neontológicas e a que inclui os dados paleontológicos são muito parecidas. Caso a última fosse enraizada em Pycnogonida, a

topologia resultante seria muito semelhante à primeira, apesar de aparecer com Trilobita como grupo-irmão de Xiphosura.

Em recente artigo focado na filogenia dos Anactinotrichida, Klomplen *et al.* (2007) incluíram a maior amostragem de Acariformes empregada até o momento, compreendendo seis espécies: três Prostigmata, dois Oribatida e um Endeostigmata. Klomplen *et al.* (2007) também empregaram uma metodologia completamente diferente para o alinhamento das sequências e inferência filogenética. Ao invés de otimização direta e parcimônia, usaram a estrutura secundária como guia e aplicaram análises de parcimônia e Bayesiana. Os resultados obtidos são bem suportados para as relações entre os Anactinotrichida, mas falta resolução para as relações inter-ordinais. Acari foi recuperado, mas sem uma hipótese clara a respeito de um grupo-irmão. Acaromorpha necessitaria de ao menos 14 passos extras em relação à árvore mais parcimoniosa.

Shultz (2007a) revisou a morfologia dos aracnídeos empregando espécies como táxons terminais de forma a testar o monofiletismo das ordens. Acaromorpha *sensu* Shultz foi obtida novamente, mas com baixo suporte e, quando os fósseis são inclusos, Acari é recuperado como difilético e Ricinulei aparece como grupo-irmão de Anactinotrichida (Criptognomae, Fig 1 D). Em relação à posição dos Acariformes, no entanto, os resultados obtidos por Shultz (2007a) devem ser interpretados com cuidado. Ele não incluiu em sua matriz os dois caracteres que levaram Alberti & Peretti (2002) a questionar a associação de Solifugae e Pseudoscorpiones (Haplocnemata): a histologia dos testículos e a estrutura dos espermatozóides. Shultz também os interpretou erroneamente ao avaliar hipóteses alternativas às recuperadas em seu estudo. Ele considerou ambas as linhagens de ácaros como relacionadas com Solifugae (Shultz, 2007a Fig. 3) quando, na verdade, Alberti & Peretti propuseram que apenas Acariformes seriam relacionados com Solifugae. Finalmente, algumas diferenças entre

as duas principais linhagens de ácaros, como a condição da região intercoxal, não foram corretamente codificadas. Para um sumário detalhado dessas diferenças referimos o leitor a Alberti (2006) e Dunlop & Alberti (2007).

2.2. Material e métodos

2.2.1. Táxons amostrados

Seguimos Giribet & Ribera (1998) em considerar Pycnogonida como um grupo externo apropriado para enraizar a árvore filogenética dos quelicerados. Em que pese a hipótese formulada por Maxmen *et al.* (2005) de que os quelíforos dos Pycnogonida teriam origem protocerebral e que a visão tradicional de que quelíceras e quelíforos sejam de natureza tritocerebral tenha sido defendida recentemente por Bitsch & Bitsch (2007), dados referentes à expressão gênica e estudos neuroanatômicos apontam quelíceras, quelíforos e as antenas dos crustáceos, insetos e miriápodes como homólogos e deutocerebrais (Damen *et al.*, 1998; Telford & Thomas, 1998; Manuel *et al.*, 2006, Brenneis *et al.*, 2008). Em que pese sua longa lista de autapomorfias, os quelíforos dos Pycnogonida devem ser considerados como verdadeiras quelíceras, oferecendo suporte morfológico para a posição dos Pycnogonida como grupo-irmão vivente dos Euchelicerata.

Tabela I. Quelicerados não-Actinotrichida inclusos nas análises. NT, Sequências obtidas durante a execução deste trabalho.

Espécies	18S	28S	Éspécies	18S	28S	Espécies	18S	28S
Classe Pycnogonida			Ordem Ricinulei			<i>Neobisium polonicum</i>	EU559357	EU559457
<i>Achelua echinata</i>	AF005438	AF005459	<i>Pseudocellus pearsei</i>	U91489	AF124956	<i>Anagarypus heatwolei</i>	EU559376	EU559482
<i>Callipallene</i> sp.	AF005439	AF005460	Ricinoididae sp	AF124930	AF062988	<i>Americhernes</i> sp.	AF124934	AF062982
<i>Endeis laevis</i>	AF005441	AF005462	Ordem Opiliones			Ordem Araneae		
<i>Colossendeis c</i>	AF005440	AF005461	<i>Siro rubens</i>	U36998	U91494	<i>Liphistius bicoloripes</i>	AF007104	AF124960
Classe Chelicerata			<i>Stylocellus</i> sp.	AF173419	Af173422	<i>Aphonopelma</i> sp.	X13457	-----
Ordem Xiphosura			<i>Odiellus trogluoides</i>	X81441	U91500	<i>Atypoides riversi</i>	DQ98169	DQ63985
<i>Limulus polyphemus</i>	U91490	U91492	<i>Pachylodes thorellii</i>	U37007	U91508	<i>Nesticus celullanus</i>	AF005447	AF124961
<i>Carcinoscorpius</i> sp.	U91491	U91493	<i>Caddo agilis</i>	U91487	U91502	<i>Lyssomanes viridis</i>	DQ66574	-----
Ordem Schizomida			<i>Sabacon cavicolens</i>	AF124944	AF124972	Tetragnathidae	NT	NT
<i>Stenochrus portoricensis</i>	AF005444	-----	<i>Leiobunum</i> sp.	AF124940	AF124968	Corinnidae	NT	NT
<i>Trithyreus pentapeltis</i>	AF124932	AF062990	<i>Nemastoma bimaculatum</i>	AF124947	AF124974	Pholcidae	NT	NT
Ordem Thelyphonida			<i>Zuma acuta</i>	AF124951	AF124978	Ordem Solifugae		
<i>Mastigoproctus giganteus</i>	AF005446	AF062989	Ordem Parasitiformes			<i>Gluvia dorsalis</i>	AF007103	AF124957
Ordem Amblypygi			<i>Opilioacarus texanus</i>	AF124935	AF124963	<i>Eusimonia</i>	U29492	AF124958
<i>Paraphrynus</i> sp.	AF005445	AF124959	<i>Amblyomma americanum</i>	AF291874	AF291874	<i>Chanbria regalis</i>	AF124931	AF062983
Amblypygi sp.	AF124933	AF062965	<i>Otobios megnini</i>	L76356	-----	<i>Eremobates</i> sp.	AY85957	AY85957
<i>Musicodamon atlanteus</i>	AY82990	AY82992	<i>Allothyrus cf australasiae</i>	AY62091	AY62662	Ordem Scorpiones		
<i>Charinus montanus</i>	NT	NT	<i>Sternothyrs braueri</i>	AY62091	AY62663	<i>Pandinus imperator</i>	AY21083	AY15653
Ordem Palpigradi			Ordem			<i>Belisarius xambeui</i>	AF005442	AF124954
<i>Eukoenenia</i> n. sp.	AF207648	AF207653	<i>Chthonius</i> sp.	EU559387	EU559438	<i>Androctonus australis</i>	X77908	AF124955
<i>Eukoenenia</i> sp.	NT	NT	<i>Pseudogarypus bicornis</i>	EU559368	EU559472			

Fig. 3. A- Dendrograma representando hipóteses filogenéticas sumarizadas por Norton *et al.*, (1993). (*) indica as linhagens representadas no presente estudo. B- Lista de táxons de Actinotrichida incluídos nas análises aqui apresentadas. NT, Sequências obtidas durante a execução deste trabalho.

Todas as ordens de quelicerados estiveram representadas, compreendendo 91 táxons terminais, dos quais 40 são ácaros Acariformes. Dentre eles, um Palpigradi, um Amblypygi, três Araneae e 32 Actinotrichida foram sequenciados no curso do presente estudo. Uma vez que uma análise cladística incluindo uma amostra representativa das linhagens de Actinotrichida ainda não foi realizada, os dendrogramas sumarizados por Norton *et al.*, (1993) foram empregados como referência para estabelecer o desenho amostral. Buscou-se incluir representantes de todas as principais linhagens de Actinotrichida. O esforço amostral está sumarizado na Tabela I e Fig. 3. O nome “Endeostigmata” foi mantido, apesar de certamente não ser um grupo monofilético, pois o nome faz lembrar imediatamente seus membros.

2.2.2. Extração, amplificação e sequenciamento

Pequenas porções de animais ou indivíduos inteiros no caso de ácaros com aproximadamente 0,5 mm ou menos, foram usados para extração de DNA genômico. Quando o indivíduo inteiro foi destruído no processo de extração, indivíduos da mesma população foram mantidos em lâminas ou álcool como material testemunho. Todo o material testemunho será depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Dados de coleta constam do Capítulo 1.

Pequenas porções de tecido utilizadas para extração foram esmagadas contra a parede de tubos Eppendorf em 10µl de água. A solução Instagene® (BIORAD), que tem por base a resina quelante Chelex 100, foi adicionada e incubada por 30' a 54°C, seguida de 8' a 100°C. A solução foi centrifugada e aproximadamente 140µl do sobrenadante foram aproveitados, o que é suficiente para 14 reações de amplificação.

O gene 18S foi amplificado usando os três pares de *primers* descritos em Giribet *et al.* (1996), ou com o segmento intermediário substituído pelo par de *primers*

“18SV4F-18SV4R”, descrito por Otto & Wilson (2001). Para a região D3 do gene 28S, foi empregado o par de *primers* 28SA-28SB, descrito por Whiting *et al.* (1997).

As reações de amplificação foram levadas a efeito em um volume total de 25µl com 0,6 unidades de *Taq* Polimerase (Fermentas), 100mM de *DNTPs*, 2,50mM de MgCl₂ e 0,40mM de cada *primer*. O programa do termociclador incluiu um passo inicial de desnaturação de 4' a 94 °C, 35 ciclos de amplificação que compreendiam 30" de desnaturação a 94°C, 30" para anelamento a 50°C, 45"-1' de extensão a 72 °C e um passo final de extensão de 5' a 72°C.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o kit Ampure® (Agencourt) e sequenciados usando-se um sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencer. Os ciclos de sequenciamento com AmpliTaq DNA polymerase, FS (Perkin–Elmer) utilizando nucleotídeos de terminação marcados (ABI Prism BigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit) foram realizados em um volume de 10µl de reação: 4µl da solução Terminator Ready Reaction Mix, 10 a 30ng/ml do produto purificado das reações de amplificação, 5pmol de *primer*, e dH₂O até completar 10µl de volume total. Os ciclos de sequenciamento consistiram de um passo inicial de desnaturação de 3' a 94°C, 25 ciclos de sequenciamento foram empregados (94°C por 10", 50°C por 5", 60°C por 4'). Os produtos das reações de sequenciamento foram precipitados com isopropanol, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Os cromatogramas direto e reverso foram reunidos utilizando-se o programa ChromasPro 1.41 (Technelysium Pty Ltd).

2.2.3 Análises Filogenéticas

O RNA ribossômico é o componente central da síntese protéica. Ele é objeto de intensa seleção estabilizadora, necessária à manutenção de sua atividade catalítica. No

entanto, essa atividade depende mais das estruturas secundária e terciária, produto do correto pareamento dos nucleotídeos, que da composição nucleotídica propriamente dita.

Nas hélices, uma mutação que atrapalhe o correto pareamento dos nucleotídeos provavelmente levará a uma redução da eficiência da molécula. Uma mutação compensatória, que restabeleça o pareamento normal será favorecida pela seleção natural, substituindo um pareamento canônico (i. e., entre citosina e guanina ou adenina e uracila) por outro, ou por um pareamento um pouco menos estável entre guaninas e uracilas (Gutell *et al.* 1994). Pareamentos entre adenina e citosina são extremamente raros, mas são similares geometricamente aos entre guanina e uracila, se protonados (Nagaswamy *et al.*, 2000; Fox, 2005).

Tal propriedade da evolução dos genes ribossomais é uma ferramenta para estabelecer a homologia entre nucleotídeos, isto é, para múltiplo alinhamento. A detecção de mutações compensatórias e semi-compensatórias é considerada como evidência de homologia e é há tempos utilizada para inferência da estrutura secundária e terciária do RNA ribossômico (Gutell *et al.* 1994, Wuyts *et al.*, 2000), que por sua vez foram largamente confirmadas por estudos cristalográficos (Gutell *et al.*, 2002).

Alinhamento tendo a estrutura secundária como guia foi feito seguindo o método descrito por Kjer (1995), exceto por empregar o programa BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) para editar as sequências. Modelos iniciais da estrutura secundária do gene 18S foram obtidos do sítio do Projeto “European Ribosomal DataBase” (Wuyts *et al.*, 2004). Modelos iniciais da estrutura secundária do gene 28S foram obtidos de Schnare *et al.* (1996). Para ambos os genes, as estruturas secundárias inferidas por Rix *et al.* (2008) também foram muito úteis.

Para regiões em que a composição nucleotídica não apresentava identidade suficiente para detectar a correspondência com os modelos disponíveis, pareamentos potenciais foram explorados com o programa Mfold (Zuker, 2003). Alinhamentos foram primeiro produzidos para cada uma das ordens de quelicerados e em seguida, motivos estruturais foram usados para alinhar o conjunto das sequências. Uma estrutura secundária de consenso foi inferida a partir do alinhamento com o auxílio do programa RNAalifold (Hofacker *et al*, 2002). *Apenas nucleotídeos em regiões cujo alinhamento é suportado por mutações compensatórias através de todas as sequências foram consideradas como homólogos.* As demais regiões foram consideradas como de alinhamento ambíguo e classificadas, segundo Gillespie (2004), em regiões de expansão e contração (REC), regiões não pareantes de alinhamento ambíguo (RAA) e regiões de compensação por deslocamento da fita (RSC). Modelos estruturais para algumas espécies são apresentados como parte dos resultados seguindo a notação empregada por Wuyts *et al.* (2004), para o gene 18S e Cannone *et al.* (2002), para o 28S. As figuras mostrando essas estruturas foram desenhadas com o programa xRNA, desenvolvido por B. Weiser & H.Noller (University of Santa Cruz).

Um arquivo tipo “fasta” contendo o alinhamento anotado com as estruturas dos genes 18S e 28S foi incluído dentre os apêndices digitais associados a tese.

Análise bayesiana. Wheeler & Honeycutt (1988) demonstraram que as regiões pareantes e de fita simples das moléculas das sequências dos genes ribossomais podem apontar topologias diferentes. Isto é esperado, visto que as mutações compensatórias violam a assunção de independência dos caracteres oriundos das regiões pareantes, uma premissa necessária tanto para o emprego da parcimônia quanto da maioria das análises empregando máxima verossimilhança ou inferência bayesiana.

A maioria dos estudos usando rRNA, no entanto, ignoram essa característica dos genes ribossomais. Savill *et al.* (2001) revisaram os modelos propostos para as regiões pareadas dessas moléculas. Quando empregados, esses modelos geralmente resultam em uma redução do comprimento dos ramos que sustentados por caracteres oriundos das regiões pareadas e são úteis para explorar o efeito de relaxar a premissa de independência de caracteres para essas regiões.

Para a inferência bayesiana da filogenia, empregamos o programa PHASE 2.0 (Versão por Gowri-Shankar & Jow, manual disponível no sítio <http://www.cs.manchester.ac.uk/ai/Software/phase/phase-2.0-manual.pdf>; Versão 1.1: Jow *et al.*, 2002) pelo fato que esse programa inclui uma grande variedade de modelos que prevêem o pareamento de bases nas hélices (Savill *et al.*, 2001). Testar cada um desses modelos está além do escopo do presente trabalho. O objetivo que desejamos atingir é verificar o impacto sobre a topologia resultante de relaxar a premissa de independência entre os caracteres dessas regiões. Assim, os seguintes modelos foram testados, utilizando-se os fatores bayesianos como critério para escolher o melhor modelo *a posteriori* (Nylander *et al.*, 2004): (a) um modelo único de quatro estados para todo o comprimento da sequência, GTR +I +G, cuja escolha foi feita com o auxílio do programa jMODELTEST (Posada, 2008); (b) um modelo misto, de quatro estados, empregando um modelo GTR +I +G para as regiões pareantes e outro para as regiões de fita simples; (c) um modelo misto, incluindo GTR +I +G para as regiões de fita simples e outro 7A, para as regiões pareantes. O modelo 7A é o mais geral dos modelos de sete estados, isto é, dos modelos em que os pareamentos A:U, U:A, G:C, C:G, G:U, e UG são considerados como estados independentes e todos os outros pareamentos são considerados pareamentos anômalos e reunidos em um único estado de caráter. O modelo inclui 26 parâmetros livres e permite assimetria nas taxas de mutação entre os

pares de bases, uma característica observada em sequências examinadas em outros estudos (Gillespie *et al.*, 2005); (d) um modelo misto, GTR +I +G para as regiões não pareantes e um modelo 16A para as regiões pareantes. Um modelo geral para todas as mutações possíveis entre os 16 pares de bases possíveis incluiria 134 parâmetros livres, o que reduziria muito a sua utilidade em análises reais. No modelo 16A, ainda que cada um dos 16 pares de bases possíveis seja codificado como um caráter independente, o número de parâmetros livres é reduzido a 19. Existem três parâmetros α_{ij} para os seis principais estados, modelando substituições simples, substituições duplas e transversões duplas; um único parâmetro para mutações de um pareamento anômalo para um estável e vice-versa; e um parâmetro para mutações simples entre pareamentos anômalos.

Um *prior* logarítmico foi designado para os comprimentos de ramo. Quatro cadeias de Markov foram empregadas em cada análise individual, iniciadas a partir de árvores geradas aleatoriamente. Três análises independentes foram feitas e se estenderam por ao menos oito milhões de gerações a fim de garantir que o espaço paramétrico fosse adequadamente explorado. O grau de convergência na estimativa dos parâmetros foi analisado utilizando-se o programa TRACER ver. 1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2004), que produz gráficos e resultados numéricos do tamanho amostral estimado (ESS). Para isso, os arquivos de saída produzidos pelo programa PHASE foram editados utilizando-se *scripts* em Perl, escritos originalmente por J.J. Gillespie, M.J. e Yoder (<http://hymenoptera.tamu.edu/rna>) e modificados por nós para se adequar à atual versão do programa.

Análises empregando parcimônia como critério de otimização. Três diferentes abordagens foram empregadas para analisar os dados sob o critério da parcimônia. Para as análises incluindo apenas dados sob homologia estática, os resultados foram obtidos

através do programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008). As análises que incluíram otimização direta empregaram o programa POY 4.0 (Váron *et al.*, 2007) e foram realizadas em paralelo por 32 processadores no *cluster* de computadores mantido no Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Na primeira, nomeada daqui em diante de análise tradicional, apenas os nucleotídeos alinhados de acordo com a estrutura secundária foram inclusos, com as inserções/deleções consideradas como um quinto estado. Buscas heurísticas levadas a cabo com o programa TNT incluíram a construção de 10000 árvores aleatoriamente, e buscas incluindo as técnicas de *Ratchet* e *Tree-fusing*, até que o mesmo consenso estrito fosse obtido vinte vezes.

Na segunda análise, aqui referida como uma “análise tradicional empregando POY”, os dados moleculares foram analisados por otimização direta, sem nenhum tratamento prévio para o estabelecimento da homologia primária, exceto pelo fracionamento das moléculas em fragmentos através de suas regiões mais conservadas, a fim de tornar mais rápidas as análises. Wheeler & Hayashi (1998) e Giribet *et al.* (2002) valeram-se dessa abordagem para inferir a filogenia dos quelicerados. Otimização direta é uma técnica de análise de sequências moleculares e, segundo trabalhos recentes, também alguns caracteres morfológicos, em que os alinhamentos múltiplos são evitados, buscando-se ao mesmo tempo a árvore e o alinhamento ótimo sob algum critério, neste caso parcimônia (Wheeler, 1996).

Similar a outros algoritmos empregados para o alinhamento de sequências moleculares, o resultado final de uma análise empregando otimização direta no POY é dependente do regime de custos escolhido *a priori* pelo pesquisador. Em uma análise empregando otimização direta, o maior número possível de regimes de custo deve ser empregado em buscas independentes a fim de explorar, o melhor possível, o espaço

paramétrico. O regime de custos que minimize a incongruência entre as partições de dados consideradas no estudo (diferente genes, genes *versus* morfologia, diferentes genes, regiões etc.) é o escolhido (Wheeler, 1995). Essas análises também são empregadas para explorar o comportamento dos dados através do espaço paramétrico, sendo consideradas, de acordo com Giribet (2003), uma maneira de avaliar a estabilidade dos nós (em oposição a Grant & Kluge, 2005).

Nas análises tradicionais empregando POY, as sequências do gene 18S foram divididas em doze blocos usando as regiões conservadas como referência e, juntamente com o fragmento do gene 28S, analisadas sob otimização direta (Wheeler, 1996). Para a análise de sensibilidade foram utilizados os seguintes regimes de custo (inserção/deleção: transversão: transição): 111, 121, 112, 211, 221, 411, 412, 421.

As buscas utilizando o programa POY incluíram 20 repetições dos comandos: *build (320); swap (trees:1,annealing:(20,2))*. Depois de completa essa busca inicial, como estratégia de refinamento para se evitar artefatos de heurística, isto é, para tentar garantir que a árvore recuperada como a mais parcimoniosa de fato o seja e não algum ótimo local, contrangiui-se a busca pela árvore mais parcimoniosa tendo-se, como guia, os grupos recuperados nas melhores vinte árvores para cada regime de custos, técnica discutida em Giribet (2007). Isso foi implementado através do comando: *swap (constraint, annealing: (40,2))*, repetido em 10 iterações diferentes.

Resultados de cada um dos regimes de custo são avaliados pelo critério da congruência. Isso é conseguido através do índice ILD (*"Incongruence Length Difference"*, Mickevich & Farris, 1981). Para calculá-lo, as partições de dados consideradas nesse caso foram a sequência de 18S por um lado e de 28S por outro. O índice é dado pela equação:

$ILD = (\text{comprimento da árvore resultante da análise combinada} - \Sigma \text{comprimento de cada uma das partições tomadas isoladamente}) / (\text{comprimento da árvore resultante da análise combinada})$.

Jordal *et al.* (2008) empregaram uma abordagem que permite, ao mesmo tempo, garantir que as hipóteses de homologia inferidas pela estrutura secundária não sejam violadas e explorar o sinal filogenético das regiões de alinhamento ambíguo. Eles combinaram, em uma análise empregando POY, cada uma das regiões de alinhamento ambíguo com as regiões alinhadas tratadas como caracteres de homologia estática.

Uma abordagem similar é empregada neste estudo e comparada com as duas análises anteriores.

Referiremos-nos a essa análise como “análise estrangida”. Para as regiões de alinhamento ambíguo (RAA), otimização direta será empregada com os mesmos regimes de custo empregados na análise tradicional acima descrita. Para as regiões pré-alinhadas, todas as transformações foram igualmente pesadas e analisadas sob homologia estática.

Para as análises estrangidas, as regiões de fita simples nas extremidades das hélices e as regiões de expansão e contração são tratadas conjuntamente. Procedeu-se assim, pois a homologia individual dos nucleotídeos dessa região não pode ser inferida através de mutações compensatórias e aparentemente a incorporação de nucleotídeos de uma região à outra é comum.

É importante lembrar que medidas de suporte usando técnicas de re-amostragem como *bootstrap* e *jackknife* sob otimização direta não são diretamente comparáveis com os resultados obtidos através da homologia estática. Por isso, para avaliar o suporte dos ramos, preferiu-se o suporte de Bremer para o cladograma tido como aquele que melhor

incorpora os dados, calculado com os comandos: *calculate_support (bremer, build (trees:5), swap (trees:2))*.

Análises morfológicas e combinadas. Os enunciados dos caracteres morfológicos propostos aqui se basearam na revisão de fontes primárias, revisões da morfologia dos grupos inclusos e na observação direta de exemplares. Eles são apresentados no apêndice II. A matriz consiste em 178 caracteres não-ordenados.

Não estamos interessados apenas em saber como a matriz aqui proposta impacta a topologia recuperada, mas também detectar eventuais limitações da otimização direta em manter a independência dos caracteres moleculares em relação aos morfológicos. Para isso, os enunciados dos caracteres apresentados por Shultz (2007a) foram aplicados aos clados amostrados, produzindo uma matriz de 202 caracteres, daqui em diante nomeada matriz B.

As análises combinadas usando as matrizes A e B repetiram as três abordagens analíticas descritas acima. Os regimes de custo nas análises que incluíram otimização direta foram os mesmos e o critério para a seleção do regime de custos também foi o da minimização da congruência, como medido pelo índice ILD. Para um dado regime de custos outro que 111, a morfologia foi pesada de acordo com a razão entre o número de passos obtido pelo no regime de custos 111. Isso foi feito para manter a contribuição do conjunto de dados morfológicos similar através dos regimes de custos testados.

2.3 Resultados

2.3.1 Características das sequências e da estrutura secundária dos genes amostrados

As sequências de 18S nas 91 espécies incluídas neste estudo variaram de 1713 a 2154 nucleotídeos entre as hélices 5 e 49, sendo que as sequências mais longas são observadas entre os Tetranychioidea, sendo *Tenuipalpus hevae*, a espécie com sequência mais longa. O intervalo de comprimento para as regiões de alinhamento ambíguo é apresentado na Fig. 5 A tomando por base a estrutura inferida para *Rostrozetes ovulum* (Acariformes, Oribatida, Fig. 5A), que é consistente com o modelo geral para os eucariotos (Wuyts *et al.*, 2000). Combinadas, as regiões alinhadas compreenderam 1581 posições, sendo 747 conservadas e, das restantes 813 posições variáveis, 568 são parcimônia-informativas.

Quando combinadas, todas as regiões de alinhamento ambíguo (RAAs, RECs e RSCs) variaram de 171 a 610 nucleotídeos. Se as sequências de Tetranychioidea são desconsideradas, esse intervalo fica reduzido a 171–263 nucleotídeos. Apesar do seu comprimento, a estrutura secundária do rRNA 18S dos Tetranychioidea não apresenta maiores modificações, já que a variação observada está associada à hiperextensão das regiões de extensão e contração da extremidade das hélices (RECs) e não ao aparecimento de novas estruturas. Uma aparente exceção é uma nova hélice na região V4 (Fig. 5 B, assinalada em vermelho). Essa hélice, que compreende de 49 a 66 nucleotídeos, deve ser considerada como exclusiva dos Tetranychioidea e assim excluída das análises constrangidas pela estrutura secundária.

O fragmento empregado do gene 28S variou de 284 a 350 nucleotídeos. A maior variação dentro de uma mesma ordem foi encontrada nas aranhas, visto que a espécie de Pholcidae sequenciada apresentou 284 nucleotídeos; em *Atypoides riversi* foram 349. A

estrutura secundária inferida é consistente com a proposta por Schnare et al. (1996) para os eucariotos, sendo notável a perda da hélice D3_1 em Pholcidae, Tetragnathidae e em todos os Acariformes. Apesar de alguns Acariformes possuírem pareamentos potenciais na região correspondente a essa hélice (veja, por exemplo, *R. ovulum* na Fig. 6 A), eles não apresentam mutações compensatórias que permitam postular a presença de uma hélice nessa região. Finalmente, essa região inclui de 3 a 34nts em Acariformes; cinco em Pholcidae; quatro em Tetragnathidae; e 17 a 50nts nas espécies que apresentam a hélice D3_1.

A substituição de um elemento da estrutura secundária por outro pode ser considerado como estados alternativos de um caráter qualitativo. Assim, um caráter “morfológico” foi adicionado às análises, sendo atribuído o estado 1 para os táxons em que a hélice D3_1 está ausente e 0 para aquelas em que esta está presente. Além disso, nucleotídeos individuais dessas duas estruturas não são diretamente comparáveis. Portanto, são postas em arquivos diferentes quando incluídas na análise constrangida pela estrutura secundária.

Finalmente, quando a hélice D3_1 é considerada isoladamente, a covariação ao longo da porção basal da hélice permite o alinhamento da região sombreada em azul na Fig. 6 B. Assim, a região foi dividida em três partes: uma tratada como pré-alinhada e duas sob otimização direta.

Excluídas as regiões de alinhamento ambíguo, o fragmento em consideração do gene 28S resultou em 256 posições, das quais 95 são conservados e 125 parsimônia-informativas.

Fig. 5. A- Modelo para a estrutura secundária do ácaro Oribatida *Rostrozetes ovulum*. Áreas em cinza referem-se a regiões alinhadas. B- Região D3 do escorpião *Androctonus australis*, note a presença da hélice D3_1. Regiões sombreadas em azul referem-se a hélice D3_1 presente na maioria dos quelicerados, número de nucleotídeos associados a RAA2a e RAA2b refere-se apenas a estes últimos. C- Região D3 do Prostigmata *Halacarus* sp., note que similarmente a *R. ovulum*, a hélice D3_1 está ausente.

Fig. 6 Filograma mostrando o consenso de maioria da fase estacionária da análise bayesiana sob o modelo misto com GTR + I + G para as regiões de fita simples e 16A para as regiões pareantes. Números associados aos ramos indicam as probabilidades posteriores dos clados.

Combinadas, as sequências 18S rRNA e 28S rRNA possuem a seguinte composição média: U = 23.1; C= 22.3; A= 26.4; e G= 28.2. Quando apenas regiões de fita simples são consideradas, os valores são U = 22.7; C= 17.1; A= 38.3; e G= 21.9; para as regiões pareantes é: U = 23.5; C= 26.6; A= 16.7; e G= 33.2. Essa composição enviesada já foi observada em várias bases de dados de genes ribossomais e pode ser explicada pela grande percentagem de adenosinas não pareadas formando motivos estruturais (Gutell *et al*, 2000).

2.3.2. Análise molecular baseada exclusivamente em homologia estática

As análises bayesianas, considerando regiões pareantes e não-pareantes sob modelos de quatro estados distintos, melhorou consideravelmente o $\ln L$ sobre o modelo considerando essas regiões indistintamente (média harmônica $\ln L$ de -25882.13 e -25904.99, respectivamente, $B_{10} = 22.863$). Mas os fatores bayesianos favoreceram claramente os modelos mistos que levam em consideração a dependência dos caracteres nas regiões pareantes. GTR +I +G\16A e GTR +I +G\7A apresentaram médias harmônicas quase idênticas para $\ln L$ (-21674.53 e -21674.57), e topologias idênticas quanto às relações interordinais. O filograma apresentado é o recuperado sob o modelo GTR +I +G\16A (Fig. 6).

A análise tradicional baseada em parcimônia recuperou 28 árvores, cada uma com 4982 passos de comprimento (CI = 0,338; RI= 0,600). A topologia de consenso estrito é apresentada na Fig. 7.

As análises bayesianas e de parcimônia recuperaram quase todas as relações interordinais com baixo suporte (*Jackknife* < 50%, Probabilidades Posteriores < 75%), exceto por Uropygi (Telyphonida + Schizomida) (*Jackknife* = 82%, Probabilidades Posteriores = 100%) e Solifugae + Acariformes (*Jackknife* = 68%, Probabilidades

Posteriores = 100%). Todas as ordens tradicionalmente aceitas, exceto Acari, que aparece separada em Actinotrichida e Anactinotrichida; e Scorpiones que aparece com baixo suporte na análise de parcimônia (*Jackknife* = 21%, Probabilidades Posteriores = 100%) foram recuperadas com alto suporte, bem como Euchelicerata, mas não Arachnida. Ao posicionar as aranhas entre os quelicerados, nem Labellata (Amblypygi + Araneae) ou Pedipalpi (Amblypygi + Uropygi) foram recuperados, mas (Uropygi + Araneae), com baixo suporte na análise de parcimônia (*Jackknife* = 19%) e alto suporte na análise bayesiana (Probabilidades Posteriores = 99%)

Quanto às relações entre os Acariformes, é notável que as análises bayesianas recuperaram, com altos valores de suporte, alguns clados tradicionalmente aceitos que não foram recuperados ou recuperados com suporte baixo pela análise de parcimônia. Este é o caso das famílias Bdellidae (*Jackknife* = 8%, Probabilidades Posteriores = 83%), Halacaridae (*Jackknife* = 10%, Probabilidades Posteriores = 100%), Astigmata + Oribatida Brachypilina (Probabilidades Posteriores = 100%), e Prostigmata (Probabilidades Posteriores = 100%).

Por outro lado, a análise de parcimônia recupera um clado formado por Tetragnathidae + Pholcidae, entre as aranhas (*Jackknife* = 73%), enquanto as análises bayesianas colocam Pholcidae em uma posição basal dentre os Araneomorpha e Tetragnathidae como grupo-irmão de *Nesticus*, suportando, dessa maneira, Orbiculariae (Probabilidades Posteriores = 100%) e Entelyginae (Probabilidades Posteriores = 100%). A análise bayesiana estimou longos ramos, levando tanto a Pholcidae quanto a Tetragnathidae e sua associação nas análises utilizando parcimônia como critério de otimização provavelmente é um artefato devido à atração de ramos longos.

Fig. 7 - Consenso estrito das 28 árvores mais parcimoniosas obtidas a partir das regiões alinhadas utilizando-se a estrutura secundária como guia (Comprimento = 4982; CI = 0.338; RI = 0.600).

2.3.3. Análises combinadas sob homologia estática dos dados morfológicos e moleculares

Como descrito na seção de métodos, procederam-se as análises combinadas dos dados morfológicos e moleculares com duas matrizes distintas, a fim de aferir a sua

influência na topologia final. As árvores obtidas das análises que utilizaram as matrizes A e B são semelhantes por suportar Amblypygi como grupo-irmão de Uropygi (Pedipalpi), Tetrapulmonata, e Arachnida (recebendo, no entanto, um suporte maior da matriz B) (Fig. 8A e 9A, respectivamente).

Levando em conta clados com baixo suporte, similar às análises apresentadas por Shultz (2007a), a segunda recuperou Palpigradi como grupo-irmão de Tetrapulmonata, Acaromorpha *sensu* Shultz (Ricinulei, Actinotrichida e Anactinotrichida) e Haplocnemata (Pseudoscorpiones + Solifugae). Na análise da matriz A, elaborada ao longo deste trabalho, Palpigradi foi recuperado como grupo-irmão de uma politomia formada por (Ricinulei + Tetrapulmonata), Anactinotrichida e (Solifugae + Acariformes). Pseudoscorpiones aparece como grupo-irmão dos escorpiões, ao invés dos solífuges.

Na análise combinada, Solifugae é obtida como grupo-irmão dos ácaros Acariformes e os pseudoscorpions como grupo-irmão dos escorpiões, independente da matriz morfológica considerada, apesar de com diferentes valores de suporte. As duas análises não oferecem hipóteses bem suportadas da posição filogenética das ordens Ricinulei, Anactinotrichida e Palpigradi.

2.3.4. Análises moleculares integrando as regiões de alinhamento ambíguo

A primeira diferença notável entre as análises padrão e constrangida pela estrutura secundária empregando o programa POY está no tempo de processamento. Para executar comandos similares de busca, o tempo computacional requerido é de aproximadamente 8,7 vezes mais longo nas análises padrão que nas constrangidas utilizando o mesmo número de processadores.

Fig 8 – A- Consenso estrito das 180 árvores mais parcimoniosas recuperadas pela análise da matriz morfológica A (comprimento= 386 passos; CI= 0,560; RI = 0,922) B- Consenso estrito das oito árvores mais parcimoniosas recuperadas na análise combinada da matriz A com os dados moleculares pré-alinhados (comprimento = 5412; CI = 0,351; RI = 0,663).

Fig 9 – A- Consenso estrito das 683 árvores mais parcimoniosas recuperadas pela análise da matriz B (comprimento= 420; CI= 0.548; RI = 0.913) **B-** Consenso estrito das quatro árvores mais parcimoniosas recuperadas pela análise combinada da matriz C e os dados moleculares pré-alinhados (comprimento = 5447; CI = 0,352; RI = 0,661).

A análise padrão empregando otimização direta recuperou uma única árvore mais parcimoniosa com comprimento de 9998 passos, CI= 0, 434, RI = 0, 676 (Fig 10 A). O regime de custos que minimiza a incongruência entre as partições consideradas é aquela em que todas as classes de mutação são recebem o mesmo peso (111). As análises constrangidas levaram à obtenção de uma única árvore mais parcimoniosa com 10095 passos e CI= 0,408, RI = 0,623. O regime de custo escolhido é o mesmo (Fig. 10 B). Os valores do índice de incongruência empregado, o ILD, são sumarizados na tabela II.

As topologias ótimas são semelhantes no que toca aos clados bem suportados. Elas compartilham os clados (Palpigradi (Solifugae Acariformes)) e (Ricinulei (Amblypygi (Araneae (Telyphonida Schizomida)))).

Tabela II- Índice ILD para a análise padrão e constrangida empregando POY e otimização direta, levando em conta apenas os dados moleculares

Regime de custos	POY, análise padrão				POY, análise constrangida			
	Comp. total	Comp. 18S	Comp. 28S	ILD	Comp. Total	Comp. 18S	Comp. 28S	ILD
1:1:1	9998	7544	2338	0,0116	10095	7616	2359	0,0119
1:1:2	15857	11931	3699	0,0143	12945	9620	3120	0,0158
1:2:1	15200	11430	3567	0,0134	13335	9891	3248	0,0147
2:1:1	11711	8702	2789	0,0188	11637	8636	2818	0,0157
2:1:2	18805	13960	4338	0,0270	15709	11466	3815	0,0272
2:2:1	18361	13567	4325	0,0255	16231	11791	4031	0,0252
4:1:1	14427	10596	3308	0,0363	14288	10391	3467	0,0301
4:1:2	23903	17564	5144	0,0500	20824	14913	4960	0,0457
4:2:1	23633	17234	5283	0,0472	21355	15210	5235	0,0426

Todas as ordens tradicionais de quelicerados, exceto Acari, foram obtidas nas duas análises, no regime de custos ótimo. Mas apenas os regimes de custo 111, 112, 121, e 221 recuperaram as aranhas como grupo monofilético. A ordem não é suportada apenas no regime de custo 411 na análise constrangida. Anactinotrichida é recuperada em uma posição bastante improvável, dada sua morfologia, como um ramo basal nas duas análises.

Diferente das análises exclusivamente moleculares e de todas contrangidas pela estrutura secundária, os valores de ILD para as análises combinadas não constrangidas utilizando otimização direta não favoreceram o regime de custos 111 de forma convincente, sendo esses valores quase idênticos ao do regime 121 (Tabela II e III).

A análise padrão utilizando otimização direta e combinando os dados moleculares e a matriz A, sob regime de custos 111, levou a apenas uma árvore mais parcimoniosa com 10451 passos, CI= 0,432, RI= 0,694 (Fig. 12 A). Ela é similar à árvore obtida sob o regime 121 exceto que este último apresenta Arachnida como monofilético. No regime 111 Xiphosura aparece como parte de um clado que denominamos nas Fig. 10-12 de “Clado A”, composto por Xiphosura, Scorpiones, Pseudoscorpiones e Opiliones.

Quando combinados com a matriz B, sob o regime de custos 111 também foi obtida uma única árvore, desta vez com 10490 passos, CI = 0,433; e RI = 0,685 (Fig. 11 A). O clado (Palpigradi (Solifugae Acariformes)), obtido nas demais análises, não foi recuperado. Palpigradi aparece na base do cladograma, e Acari aparece como monofilético, tendo por grupo irmão Solifugae. Sob o regime 121 Acari também foi recuperado como monofilético, assim como Arachnida.

Fig. 10. **A-** Única árvore mais parcimoniosa, com comprimento de 9998 passos, obtida pela análise padrão utilizando otimização direta e incluindo apenas dados moleculares. **B-** Única árvore mais parcimoniosa, com 10095 passos, obtida da análise empregando a otimização direta apenas para as RAAs, e considerando as demais regiões como pré-alinhadas.

Tabela III. Índice ILD para as análises combinadas empregando a matriz B. Note que os valores de comprimento da árvore morfológica foram corrigidos para manter uma correspondência aproximada com a porcentagem de dados morfológicos e moleculares sob o regime de custos 1:1:1.

Regime de custos	POY, análise padrão				POY, análise constrangida			
	Morf.	Σ 18S-28S	Comp. Total	ILD	Morf.	Σ 18S-28S	Comp. total	ILD
1:1:1	420,0	9882	10490,0	0,0179	420,0	9975	10587,0	0,0181
1:1:2	666,1	15630	16657,6	0,0217	538,6	12740	13590,9	0,0230
1:2:1	638,5	14997	15923,0	0,0181	554,8	13139	13976,0	0,0202
2:1:1	492,0	11491	12304,0	0,0261	484,2	11454	12229,0	0,0238
2:1:2	790,0	18298	19801,4	0,0360	653,6	15281	16530,6	0,0361
2:2:1	771,3	17892	19265,0	0,0312	675,3	15822	17031,2	0,0313
4:1:1	606,1	13904	15194,0	0,0450	594,4	13858	15011,2	0,0372
4:1:2	1004,1	22708	25226,0	0,0600	866,4	19873	21970,4	0,0560
4:2:1	992,8	22517	24981,0	0,0589	888,5	20445	22488,1	0,0513

Se as análises padrão levaram a consideráveis diferenças na topologia obtida para os regimes de custos ótimos ao combinar diferentes matrizes, as análises constrangidas pela estrutura secundárias são notáveis por recuperar a mesma topologia no que se refere às relações interordinais, além de apontar claramente para um único regime de custos como o que minimiza a incongruência. A análise combinada com a matriz B levou à obtenção de uma árvore com 10587 passos (CI = 0,411; RI = 0,659, Fig 11B); a análise combinada com a matriz A levou a uma única árvore com 10549 passos (CI = 0,412; RI = 0,665; Fig 12B). Os resultados dessa última análise são discutidos na próxima seção. Os valores de suporte de Bremer para seus ramos é reportado na Fig. 13.

Fig. 11. A- Única árvore mais parcimoniosa de 10490 passos recuperada da análise padrão utilizando otimização direta combinada com a matriz B. B- Única árvore mais parcimoniosa, com comprimento de 10587 passos baseada na análise constrangida pela estrutura secundária combinada com a matriz B.

Fig. 12. A- Árvore mais parcimoniosa, com comprimento de 10463 passos, obtida pela análise dos dados moleculares sob otimização direta e a matriz A. B- Árvore mais parcimoniosa, com 10549 passos, obtida pela análise dos dados moleculares constrangidos pela estrutura secundária combinados com a matriz morfológica A.

Tabela IV. Índices ILD para as análises combinando os dados moleculares com a matriz morfológica, elaborada no escopo deste trabalho (Matriz A). Note que os valores para a matriz morfológica foram corrigidos a fim de manter uma correspondência aproximada com sua importância no regime de custos 1:1:1.

Regime de custos	POY, análise padrão				POY, análise constrangida			
	Morf.	Σ 18S- 28S	Comp. Total	ILD	Morf.	Σ 18S- 28S	Comp. total	ILD
1:1:1	386,0	9882	10451,0	0,0175	386,0	9975	10549,0	0,0178
1:1:2	612,2	15630	16600,8	0,0216	495,0	12740	13539,1	0,0225
1:2:1	586,8	14997	15865,0	0,0177	509,9	13139	13920,1	0,0195
2:1:1	452,1	11491	12257,4	0,0256	445,0	11454	12177,4	0,0229
2:1:2	726,0	18298	19720,4	0,0353	600,7	15281	16483,0	0,0365
2:2:1	708,9	17892	19198,4	0,0311	620,6	15822	16987,6	0,0321
4:1:1	557,0	13904	15122,6	0,0437	546,3	13858	14967,6	0,0376
4:1:2	922,8	22708	25123,6	0,0594	796,2	19873	21917,3	0,0569
4:2:1	912,4	22517	24873,6	0,0581	816,5	20445	22438,4	0,0524

2.4. Discussão

2.4.1 Comentários a respeito da metodologia

Shultz (2007a) chamou nossa atenção para o fato de, segundo ele, “existir uma tendência de considerar a filogenia em nível de ordem dos aracnídeos como menos resolvida e pôlemica do que é realmente o caso”. Se apenas as topologias publicadas empregando dados morfológicos ou dados morfológicos e moleculares combinados sob otimização direta, isto é certamente verdade. Mas, quando olhamos para as análises moleculares, vemos que elas distanciam-se consideravelmente dessa alegada convergência (compare Fig. 1 e 2 acima).

Fig. 13. Topologia recuperada através da análise cujo estabelecimento da homologia foi constrangida pela estrutura secundária, sob o regime de custos 111, valores referência aos valores de suporte de Bremer.

Uma possível explicação para isso é a maneira como a homologia molecular foi estabelecida nas análises combinadas que nos precederam.

Como em outras ciências comparativas, a sistemática é baseada na noção de homologia. A formulação de uma hipótese de homologia é um processo de dois passos. No primeiro, utilizando observações e conhecimentos externos às análises filogenéticas, o pesquisador propõe caracteres e seus estados. No segundo, os caracteres formulados de maneira independente são reunidos em uma matriz e submetidos à análise filogenética. Depois de obtida uma topologia é que os estados de caráter que receberam o mesmo valor podem ter sua similaridade explicada por uma origem no ancestral comum exclusivo das espécies que o detém (sinapomorfia) ou foram adquiridos independentemente (homoplasia) (de Pinna, 1991). Note que nesse processo, a inferência filogenética não é informativa a respeito da homologia das estruturas em que se baseiam os caracteres. Ela é informativa a respeito da homologia dos estados do caráter. Podem, é claro, quando se observa o conflito dos estados de caráter com a topologia obtida, conduzir o pesquisador a reexaminar as informações que o levaram a delimitar seus caracteres, como afirmamos acima, externas à análise propriamente dita.

Podemos ilustrar isso com um exemplo corrente no debate sobre a homologia dos apêndices cefálicos dos artrópodes. Até a publicação dos trabalhos independentes de Damen *et al.* (1998) e Telford & Thomas (1998) era amplamente aceito que as quelíceras e as antenas dos insetos, miriápodes e crustáceos eram apêndices de segmentos distintos, as primeiras tritocerebrais e as últimas deutocerebrais. Assim, a quelícera, a segunda antena dos crustáceos e a região intercalar dos insetos seriam homólogos e estados do mesmo caráter, a condição dos apêndices do segmento tritocerebral.

A proposta de que as quelíceras são na verdade homólogas às antenas foi formulada fora de qualquer consideração às análises filogenéticas publicadas, mas baseada por observações da embriologia de uma aranha e um ácaro Acariforme. Ao alcance das análises filogenéticas está verificar o eventual conflito da distribuição de antenas e quelíceras com uma dada topologia. Mas isso não nos levaria a questionar a condição segmentar dessas estruturas.

Assim, como argumentado em Rieppel (2005), as hipóteses de homologia primária podem ser definidas como hipóteses que devem ser verificadas em seu próprio âmbito.

Na sistemática molecular, o estabelecimento de hipóteses de homologia primária é feito através dos alinhamentos múltiplos, crucial em moléculas como as do RNA ribossomal em que variações no comprimento da molécula podem atingir centenas de nucleotídeos. A variação de comprimento é em si fonte de informação filogenética (Giribet & Wheeler, 1999), mas na medida em que não é diretamente observada, mas inferida a partir de algum critério, introduzem incerteza ao alinhamento. A abordagem mais frequente é a detecção das regiões de alinhamento ambíguo por algum critério e seu descarte. Junto perde-se toda a informação filogenética contida nessas regiões. Para evitar a perda desses caracteres, vários métodos foram propostos para se incorporar as regiões de alinhamento ambíguo às análises (Lee, 2001).

A otimização direta procura resolver tal problema ao inferir simultaneamente a filogenia e a homologia entre os nucleotídeos. Wheeler & Giribet (2009) deixaram claro seu julgamento a respeito dos alinhamentos múltiplos que consideram como um procedimento não científico. Segundo esses autores, as sequências devem ser analisadas o mais próximo possível de como são obtidas do sequenciamento. De fato, os

proponentes do POY consideram os alinhamentos múltiplos mais do que sem utilidade, deletérios mesmo à análise:

“Da mesma forma que cada cladograma possui por origem um conjunto (potencialmente) único de caracteres, cada cladograma pode ter um conjunto único de correspondências entre os atributos observados. A não ser que essas correspondências sejam não constrangidas e que se permita que elas sejam otimizadas juntas com suas transformações, resultados condicionados e enviesados poderão ser obtidos. Esse viés pode vir das premissas do investigador, e dos seus (suas) noções do que é apropriado para comparação e condicionar a hipótese mais em concordância com suas preconcebidas correspondências de homologia ‘primária’” (Wheeler *et al*, 2006, p. 11).

Nesse fragmento, Wheeler e colegas argumentam por uma abordagem a sistemática classificada como instrumentalista por Rieppel (2007), que compreende um ponto de vista particular a respeito da natureza e emprego da evidência na inferência filogenética. Para eles, a unidade operacional da análise filogenética não são mais os caracteres e seus estados, mas os “atributos observados” que devem entrar diretamente nas análises sem passar pelo filtro (sempre equivocado?) da subjetividade do sistemata, ou constrangido por considerações externas à análise filogenética.

Simmons (2004) traz considerações especialmente importantes para elucidar a origem da percepção de estabilidade dos resultados das análises cladísticas moleculares e combinadas a que se refere Shultz (2007a) e a posição dos ácaros Acariformes como obtido nos cladogramas das figuras 11A e 12A. Simmons (2004) argumenta que o

estabelecimento de hipóteses de homologia primaria é um passo imprescindível para as análises filogenéticas, pois é ele que garante a independência entre os caracteres.

A otimização direta, como implementada no programa POY, geralmente emprega a parcimônia para otimizar a homologia entre os nucleotídeos. Como vimos, em uma análise padrão, testam-se vários valores de custos e escolhe-se um deles através do critério da congruência. Tanto a parcimônia como a congruência exigem que os caracteres sejam independentes, já que se o estado de um caráter é dependente de outro equivale a sobre-pesar um único evento evolutivo e, se os estados dos caracteres em uma partição são dependentes de outra partição, a análise será enviesada em direção a uma maior congruência entre eles.

A dependência entre caracteres pode ser produto do compartilhamento da mesma mecânica causal, como ao ser objeto das mesmas forças seletivas ou estar ligado por mecanismos de desenvolvimento. Mas Simmons (2004) argumentou que, quando analisados em conjunto, dados moleculares não-alinhados e dados sob homologia estática (sequências pré-alinhadas ou morfologia) utilizando otimização direta, o resultado final será enviesado em direção ao sinal filogenético dos dados sob homologia estática. A causa dessa dependência não é relacionada com a natureza biológica subjacente aos dados empregados, mas pela maneira como a otimização direta age aos estabelecer a homologia dos dados moleculares. Ele argumentou que enquanto otimiza o comprimento da árvore, o conflito potencial entre as moléculas analisadas sob otimização direta e os caracteres sob homologia estática é apagado pela liberdade com que o algoritmo pode mudar a posição relativa dos nucleotídeos. Rieppel (2007) apresentou argumentos semelhantes e referiu-se a isso como a “fluidez” dos enunciados dos caracteres.

Fig. 14. Sequências da região D3, desde a hélice H628 até a D3_2 de dois ácaros acariformes (*Arrenurus* e *Schusteria*), um Anactinotrichda (*Amblyoma*) e um Solifugae (*Eremobates*). A- Sequências parcialmente alinhadas, com as regiões alinhadas de acordo com a estrutura secundária sombreadas em azul. Os parênteses indicam posições pareantes, pontos regiões alinhadas não pareantes e (*) indica regiões consideradas como de alinhamento ambíguo. Note que D3_2 é ausente nos Acariformes. B- Alinhamento implícito ligado a árvore mais parcimoniosa das análises padrão sob otimização direta, sob o regime de custos 1:1:1. C- Alinhamento implícito, sob o mesmo regime de custos, análise padrão sob otimização direta combinada com a matriz B, obtida a partir da aplicação dos enunciados dos caracteres propostos por Shultz (2007a).

Usualmente os dados morfológicos possuem limitada influência sobre a topologia final quando combinados com os dados moleculares (veja e.g. Wortley & Scotland, 2006, a respeito do impacto sobre a resolução e suporte). Essa influência é limitada pelo pequeno número de caracteres que geralmente compõe as matrizes morfológicas, se comparadas com as matrizes moleculares. Durante uma análise padrão empregando POY, no entanto, os dados morfológicos influenciam a topologia final por também (A) seu efeito no estabelecimento da homologia molecular dado um determinado regime de custos (B) na escolha do regime de custos ótimos, desde que essa decisão é tomada em base a maximizar a congruência entre as partições de dados.

Isto explica a disparidade entre a posição e mesmo monofilia ou difilia dos ácaros quando os resultados combinados são comparados com os oriundos das análises exclusivamente moleculares em Wheeler & Hayashi (1998) e, devido ao seu maior esforço amostral, em Giribet *et al* (2002) e nas análises por nós apresentadas acima. Vale lembrar que nos dois primeiros, o receio dos autores era que os dados morfológicos fossem eclipsados pelos dados moleculares. Giribet *et al* (2002), por exemplo, aplicaram o mesmo peso aos dados morfológicos que o maior peso de cada esquema de custos. Aplicamos aqui um esquema muito mais conservador.

Isto também é exemplificado na Fig. 14, na qual são comparados os alinhamentos implícitos correspondentes às árvores obtidas quando analisados apenas os dados moleculares e quando esses foram combinados com uma das matrizes morfológicas.

Apesar da inferência filogenética não poder ser enquadrada em um contexto falsificacionista (Vogt, 2008, Rieppel, 2007, *contra* Kluge, 2003), os pesquisadores estão interessados em verificar o quão plausíveis são as hipóteses filogenéticas correntes. A “dependência epistemológica” criada com a otimização direta reduz a severidade desse “teste”, e dificulta a descoberta de potenciais homoplasias. Por exemplo, a convergência do gnatossoma é recuperada na análise constrangida, mas não na análise padrão utilizando a otimização direta, combinadas com a mesma matriz morfológica, a matriz B, baseada nos caracteres de Shultz (2007a).

Também evidente na Fig. 14 é que, similar a outros métodos de alinhamento múltiplo baseado na minimização de custos atribuídos a mudanças nucleotídicas, POY não é capaz de recuperar as relações de homologia inferidas pelas estruturas secundárias das moléculas de rRNA (Hickson *et al.*, 2000).

Este estudo mostra algumas formas de como o reconhecimento das estruturas secundárias leva a formular hipóteses de homologia mais precisas. Interessante notar, inclusive, que os valores de incongruência são similares para o regime de custo ótimo na análise constrangida, algo inesperado já que o POY procura minimizar a incongruência. Duas decisões motivadas pelo estudo da estrutura secundária podem explicar isso. Exemplos de como aproveitar a informação da estrutura secundária nas análises filogenéticas podem ser encontradas em Swain & Taylor (2003).

Em primeiro lugar, uma hélice extra, ausente em todos os outros quelicerados pôde ser determinada nas espécies pertencentes à superfamília Tetranychidea (Fig 2B). A emergência de novas hélices em táxons específicos é documentada desde os estudos iniciais relacionados à estrutura secundária do RNA ribossomal (e.g. Gorab *et al*, 1995). Os nucleotídeos contidos nesta nova estrutura não possuem homologia defensável com a das demais espécies, mas em algoritmos baseados na minimização de custos, o POY inclusive, esses nucleotídeos são considerados homólogos com nucleotídeos de outras sequências.

No segundo caso, com consequências mais profundas para as análises aqui apresentadas, há a convergência no comprimento das sequências do fragmento do gene 28S que levam a ordem Araneae a ser recuperada como monofilética apenas nos regimes de custos 111, 112, 121, 221. Nas análises exclusivamente moleculares, as famílias Pholcidae e Tetragnathidae aparecem agrupadas com os ácaros Acariformes nos regimes de custo 411, 412, e 421, e *Atypoides* aparece agrupado com Ricinulei nos regimes 211 e 212.

No primeiro caso, o estudo da estrutura secundária mostrou que as sequências do gene 28S de Tetragnathidae, Pholcidae (aranhas) e ácaros Acariformes apresentam a perda convergente da hélice D3_1. Neste caso, adotou-se a abordagem de considerar a

presença e ausência da hélice D3_1 como estados alternativos de um caráter qualitativo e incluir os nucleotídeos em arquivos separados.

O exame da estrutura secundária também explica a associação de *Atypoides riversi* e Ricinulei, já que eles possuem grandes inserções em duas hélices diferentes, porém contíguas (as hélices LSU D3_2 e D3_3). As regiões de expansão e contração correspondentes a essas hélices foram incluídas em arquivos diferentes e essa convergência no comprimento do fragmento não interferiu no resultado final das análises.

As vantagens de integrar as regiões de alinhamento ambíguo ficam evidentes ao comparar a resolução das árvores obtidas, mesmo as análises “padrão” utilizando a otimização direta, e as análises que empregam apenas caracteres estáticos. São elas que suportam o monofiletismo de Tetrapulmonata e a associação de Ricinulei a esses últimos, duas hipóteses que também encontram suporte na morfologia. Isso faz-nos concordar com os argumentos, por exemplo, de Giribet & Wheeler (1999) a respeito da inclusão da informação das regiões que apresentam inserções/deleções nas análises filogenéticas.

Mas fazemos isso com algumas ressalvas. A abordagem empregada aqui, como admitem os proponentes do POY, mesmo com o alinhamento parcial das sequências não permitem um cálculo preciso dos valores de suporte.

As inserções e deleções não são observações, mas inferências, e como tal estão sujeitas a incerteza em sua estimativa. A otimização direta nos oferece uma estimativa pontual do alinhamento ótimo dado um regime de custos que é providenciado pelo pesquisador, que não é informativo a respeito do intervalo de confiança dessa estimativa. Apesar das análises de sensibilidade colecionar certo número de outras

estimativas pontuais, elas também não podem ser relacionadas ao suporte dos ramos no regime de custos recuperado como ótimo.

Portanto, a inclusão das RAAs empregando otimização direta evita o desperdício de informação filogenética e melhora a resolução. Ao aplicar a estrutura secundária para estabelecer a homologia primária de nucleotídeos individuais e regiões de RAAs melhora-se a independência entre as partições de dados moleculares e morfológicos. Mas fica sem solução uma estimativa do suporte dos nós que seja capaz de integrar a incerteza no estabelecimento da posição das inserções e deleções nas regiões de comprimento variável.

Redelings & Suchard (2005) propuseram um método para estimar alinhamento e filogenia simultaneamente em um contexto bayesiano. Ele permite a estimativa da incerteza do alinhamento e o incorpora na estimativa de suporte dos nós. Além disso, as taxas com que aparecem indels são estimadas da mesma forma que as taxas de substituição em análises bayesianas convencionais, dispensando a escolha a priori de regimes de custos. Esperamos que esses desenvolvimentos permitam estimativas mais apropriadas dos suportes de nós do que as que apresentamos aqui. Por enquanto, são métodos implementados em programas que consomem um esforço computacional tão grande que possuem limitada utilidade para conjuntos de dados do porte das analisadas aqui.

2.4.2. Posição filogenética dos ácaros Acariformes

Acaromorpha *sensu* Shultz não é suportado pelos dados morfológicos ou moleculares apresentados aqui. De fato, os dois convergem em posicionar Ricinulei como grupo-irmão de Tetrapulmonata. Entre as possíveis sinapomorfias desse grupo tem-se a presença de um tritosterno, uma característica também compartilhada por

vários ácaros Anactinotrichida (Ch. 12), apotele da quelícera articulada dorsalmente (Ch. 28), perda do segmento proximal da quelícera, convergente com Acariformes, Solifugae e Pseudoscorpiones (Ch. 27), espermatozóides enovelados, também presente nos pseudoescorpiões (Ch.162) e a presença de feixes de microtúbulos associados ao núcleo durante a espermiogênese (Ch. 167). A associação de Ricinulei e Tetrapulmonata é confirmada pela registro fóssil, desde que compartilham várias possíveis apomorfias com Trigonotarbida, como a palpos com quelas formadas pela oposição da apotele e tarso (Ch. 41), presença de um mecanismo de travamento entre o prossoma e o opistossoma (Ch. 68), tergitos opistossomais divididos longitudinalmente (Ch. 69), e a presença de diplosegmentos compostos pela fusão dos tergitos opistossomais 2 e 3 (Ch. 70) (Dunlop, 1996; Dunlop *et al.*, 2009). Trigonotarbida possui seus pulmões foliares descritos em detalhes e presentes nos segmentos 2 e 3 do opistossoma, a condição fundamental definidora de Tetrapulmonata (Kamenz *et al.*, 2008).

Como discutido acima, Acari não foi recuperado no regime de custos que minimize a incongruência entre as partições de dados em nenhuma análise, exceto na análise não constrangida combinada com a matriz B, derivada dos enunciados de caracteres apresentados em Shultz (2007a). A posição de Anactinotrichida não pôde ser abordada aqui, visto que nossas análises não oferecem uma análise com apreciável suporte para seu posicionamento entre os Chelicerata. A posição basal em que foram recuperados na árvore que melhor incorpora as evidências reunidas não é sustentada em sua morfologia. Hipóteses alternativas seria seu posicionamento como grupo-irmão de Ricinulei, como grupo-irmão de Pseudoescorpiones e como um ramo basal derivado da linhagem que deu origem aos Tetrapulmonata.

A associação de Ricinulei e Anactinotrichioda, o clado Criptognomae, hipótese discutida por Van der Hammen (1979), implicaria na perda paralela do artículo proximal

da quelícera e que a torção em 180° da articulação da apotele seja independente em Ricinulei e Tetrapulmonata. Possíveis sinapomorfias seriam a presença de larvas hexápodes durante seu desenvolvimento e a fusão da coxa dos palpos.

A associação entre Pseudoscorpiones e Anactinotrichida (Giribet *et al.*, 2002) e entre Pseudoscorpiones e Acari (Klompen *et al.*, 2007) já foram sugeridas em análises moleculares anteriores. Como potencial apomorfias compartilhadas tem-se a fusão do *labrum* e o epistômio, formando a placa epistomolabral (Car. 13), e a apotele da quelícera com articulação ventral (Car. 28), duas características também presentes entre os Solifugae e Acariformes.

Finalmente, a presença de um *tritosternum* (Car. 12), e a maneira como os fluidos produzidos pelas glândulas coxais alcançam a câmara pré-oral (Car. 115) sugerem que os Anactinotrichida podem ter divergido precocemente da linhagem que deu origem aos Tetrapulmonata, Ricinulei e Trigonotarbida. Ainda que seja um argumento frágil, poder-se-ia objetar que essa hipótese levaria a uma origem extremamente antiga aos Anactinotrichida, sendo que o seu registro fóssil restringe-se do Mesozóico ao presente (Dunlop *et al.*, 2008)

Já a associação entre Solifugae e Acariformes é suportada pela condição da região esternal com coxas imóveis e medialmente contíguas ou fusionadas, pela fusão do lábio ao epistômio, e pela articulação ventral da apotele da quelícera (Car. 7, 13, 28), características estas compartilhadas com os pseudoscorpídeos (Car. 7), ou com os Pseudoscorpídeos e ácaros Anactinotrichida (Car. 13, 28). Exclusivas de Solifugae e Acariformes tem-se a perda da carioteca durante a espermiogênese (Car. 158, apesar de que um fenômeno similar pode ocorrer em alguns Xiphosura), e a estrutura fina dos testículos (Car. 168).

A histologia dos testículos e as características subcelulares dos espermatozóides são, de fato, as características mais impressionantes a associar os dois grupos (Alberti & Peretti, 2002; Klann *et al.*, 2009; e próximo capítulo dessa tese), e não foi incluída nas análises morfológicas apresentadas por Shultz (2007a). Nos ácaros Anactinotrichida, por exemplo, a espermiogênese pode ter seu progresso observado ao longo dos testículos em sentido aproximadamente anterior-posterior e espermatogônias podem ser observadas nos adultos (Alberti & Coons, 1999). Os testículos não possuem uma região secretora, apresentando espermatogônias e espermátócitos intercalados a células somáticas. Em Acariformes e Solifugae, as espermatogônias estão ausentes nos adultos, sendo que nos últimos sequer espermátides são encontradas, apenas espermatozóides maduros. Os testículos têm orientação dorso-ventral, com uma região germinativa dorsal contendo os espermátides e/ou espermatozóides embebidos no citoplasma de uma ou mais células somáticas e uma região secretora, comumente com microvilosidades bem desenvolvidas, ambas entregando seus produtos em um lúmen medial.

2.4.3. Posição filogenética dos Palpigradi, Xiphosura e o problema do monofiletismo de Arachnida

Palpigradi é uma das ordens viventes de aracnídeos menos conhecidas. Características como a morfologia do endosternito levaram alguns autores a considerar os Palpigradi como aracnídeos basais (Firstmann, 1973). Alternativamente, eles já foram considerados como proximamente relacionados a Acariformes (Van der Hammen, 1982) e a Tetrapulmonata (Shultz, 2007a). A posição melhor suportada e mais estável através das análises apresentadas aqui é a de grupo-irmão de Solifugae+Acariformes, hipótese que chamaremos daqui em diante de hipótese “Cephalosomata”.

O nome Cephalosomata sublinha a ausência de uma placa única cobrindo os primeiros seis segmentos que portam apêndices. Ao invés disso, e à semelhança dos Pycnogonida e Schizomida, Palpigradi, Solifugae e Acariformes (devido à presença da ranhura sejugal), apresentam os quatro apêndices anteriores cobertos por um escudo chamado de Cephalosoma ou Propetidium (Dunlop & Arango, 2005).

Sendo obtido apenas quando os dados moleculares são inclusos nas análises, “Cephalosomata” é suportado pela presença de um cephalosoma/propetidium (Car. 1); pela ausência do flagelo do espermatozóide (Car. 161, também presente nos ácaros Anactinotrichida e opiliões, exceto Cyphophthalmi), apesar dessa característica ainda não ter sido explorada no gênero *Eukoenenia*, mas apenas em *Prokoenenia*. A presença de uma região secretora nas glândulas coxais (Car. 115) e o suposto número de segmentos embrionários (Car. 66) unem Solifugae e Palpigradi, mas estão ausentes nos Acariformes. Esses caracteres são altamente homoplásticos e pouco estudados, o que oferece um frágil suporte morfológico ao grupo. Poderíamos ainda estender as semelhanças das três ordens à abertura genital trilobada dos Palpigradi e Acariformes.

Apesar disso, devemos admitir que alguns aspectos da morfologia de “Cephalosomata” podem trazer novas evidências em suporte a esse grupo.

Solifugae é único entre os aracnídeos por apresentar o mais completo conjunto de brotos embrionários de apêndices no opistosoma, os possuindo do primeiro ao décimo segmento opistosomal (Yoshikura, 1975). A maioria deles degenera rapidamente, mas os estigmas desenvolvem-se atrás dos terceiro a quinto segmentos. Os mesmos segmentos desenvolvem os sacos pulmonares dos Palpigradi pertencentes ao gênero *Prokoenenia*, estruturas que, como o nome indica, são tradicionalmente associadas à troca gasosa. Essas estruturas são frequentemente referidas como homólogas a estruturas semelhantes encontradas na ordem Amblypygi (Alberti *et al*,

1992), mas foram consideradas por Van der Hammen (1982) como homólogas aos acetábulos genitais encontrados nos Acariformes, devido ao desenvolvimento pós-embrionário similar.

A natureza apendicular dos acetábulos genitais não é demonstrável a partir de observações embriológicas tradicionais, uma vez que brotos de apêndices não são conhecidos nos embriões dos Acariformes. Mas eles compartilham a mesma histologia e função, sendo considerados homólogos seriados dos órgãos de Claparède (Bartsch, 1973; Alberti, 1977). Estes, por sua vez, são exopoditos da segunda perna desses animais como ficou claro a partir de estudos de desenvolvimento (Thomas & Thelford, 1999).

Portanto, os sacos pulmonares dos Palpigradi, os espiráculos dos Solifugae e os acetábulos genitais dos Acariformes podem ser produtos diferentes da retenção de apêndices opistossomais nos segmentos três a cinco dessas ordens.

As análises não suportam Arachnida, sendo que Xiphosura foi obtido em um grupo que inclui também Scorpiones, Pseudoscorpiones e Opiliones na hipótese oriunda das análises constrangidas pela estrutura secundária combinadas com a matriz morfológica aqui apresentada. É digno de nota que as três últimas ordens são recuperadas juntas na análise morfológica graças principalmente a caracteres musculares e apendiculares (Fig 7A). Esse grupo remete aos Dromopoda, proposto por Shultz (1990), com a exclusão de Solifugae.

Um problema já experimentado anteriormente em análises que incluem dados exclusivamente neontológicos é que muitas possíveis plesiomorfias dos quelicerados não são distinguíveis entre os Pycnogonida, o que leva a otimizá-las como autapomorfias de Xiphosura. Podemos listar a presença de uma margem pleural bem desenvolvida (Car. 3), presença de uma dobra cefálica (Car. 9), a boca dirigida postero-

ventralmente (Car. 11), telson pós-anal bem desenvolvido (Car. 23), presença de gnatobases (Car. 47), presença de suspensores endosternais nos somitos opistosomais I e II (Car. 125). Esses caracteres não são claramente aplicáveis ou ausentes nos Pycnogonida, mas a maioria é evidente na maioria dos artrópodes do Paleozóico considerados, em algum momento, como proximamente relacionados aos quelicerados. A inclusão desses fósseis é fundamental para a correta polarização de tais caracteres, mas vai além dos objetivos do presente estudo. Parte dessa informação é discutida junto aos enunciados dos caracteres empregados na matriz A.

2.5. Referências

- Alberti, G. 1977. Zur Feinstruktur und Funktion der Genitalnäpfe von *Hydrodroma despiciens* (Hydrachnellae, Acari). *Zoomorphology*, 87, 155-164.
- Alberti, G. 1979a. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Coxaldrüsen von Walzenspinnen (Arachnida: Solifugae). *Zoologischer Anzeiger*, 203, 48-64.
- Alberti, G. 1979b. Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiozytogenese von *Prokoenenia wheeleri* (Rucker, 1901) (Palpigradi, Arachnida). *Zoomorphologie*, 94, 111-120.
- Alberti, G. 1995. Comparative spermatology of Chelicerata: Review and Perspective. In: Jamieson, B. G. M., Ausio, J. & Justine, J.-L. Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*. 166, 203–230.
- Alberti, G. 2000. Chelicerata.. In Adiyodi, K. G., Adiyodi, R. G. & Jamieson, B. G. M. 2000. *Reproductive biology of Invertebrates*, Volume IX, Part B. Oxford & IBH Publishing Co., New Dheli & Calcutta. 311–388

- Alberti, G. 2005. Double Spermatogenesis in Chelicerata. *Journal of Morphology*, 266, 281-297
- Alberti, G. 2006. On some fundamental characteristics in acarine morphology. *Atti della Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, 2005 (2006), 315-360.
- Alberti, G. & Coons, L. B. 1999. Acari-Mites. In: Harrison F. W. *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol 8c. John Wiley & Sons, Inc., New York, 515-1265.
- Alberti, G., Kaiser, T., & Löwenfeld, I. K. 1992. Zur Feinstruktur und Funktion der Ventralsäcken und vergleichbarer Organe bei Spinnentiere (Arachnida). *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 85, 197.
- Alberti, G., Lipke, E. & Giribet, G. 2008. On the ultrastructure and identity of the eyes of Cyphophthalmi based on a study of *Stylocellus* sp. (Opiliones, Stylocellidae). *Journal of Arachnology*, 36, 379-387.
- Alberti, G. & Peretti, A. V. 2002. Fine structure of male genital system and sperm in Solifugae does not support a sister-group relationship with Pseudoscorpiones (Arachnida). *The Journal of Arachnology*, 30, 268-274.
- Anderson, D. T. 1973. *Embryology and phylogeny in annelids and arthropods*. Pergamon Press, Oxford, 495pp.
- Anderson, L. I. & Selden, P. A. 1997. Opisthosomal fusion and phylogeny of Palaeozoic Xiphosura. *Lethaia*, 30, 19-31.
- Arango, C. P. 2002. Morphological phylogenetics of the sea spiders (Arthropoda: Pycnogonida). *Organisms Diversity & Evolution*, 2, 107–125
- Bartsch, I. 1973. *Porohalacarus alpinus* (Thor) (Halacaridae, Acari), ein morphologischer Vergleich mit marinen Halacariden nebst Bemerkungen zur Biologie dieser Art. *Entomologisk Tidskrift*, 74, 116-123.

- Bitsch, J. & Bitsch C. 2007. The segmental organization of the head region in Chelicerata: a critical review of recent studies and hypotheses. *Acta Zoologica* (Stockholm), 88, 317-335.
- Börner, C. 1902. Arachnologische Studien (II und III). *Zoologischer Anzeiger*. 25, 433-466.
- Braddy, S. J., Aldridge, R. J., Gabbott, S. E. & Theron, J. N. 1999. Lamellate book-gills in a late Ordovician eurypterid from the Soom Shale, South Africa: support for a eurypterid-Scorpion clade. *Lethaia*, 32, 72-74.
- Brenneis, G., Ungerer, P. & Scholtz, G. 2008. The chelifores of sea spiders (Arthropoda, Pycnogonida) are the appendages of the deutocerebral segment. *Evolution & Development*, 10, 717-724.
- Bruton, D. L. 1981. The arthropod *Sidneyia inexpectans*, Middle Cambrian, Burgess Shale, British Columbia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 295, 619–56.
- Buxton, B. H. 1913. Coxal glands of arachnids. *Zoologische Jahrbucher*, Suppl. XIV, 16-50.
- Buxton, B. H. 1917. Notes on the anatomy of arachnids. *Journal of Morphology*, 29, 1-25.
- Cannone, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D'Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L.V., Muller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N. & Gutell, R.R. 2002. The Comparative RNA Web (CRW) Site: An online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, 3, 15.
- Chamberlin, J. C. 1931. *The arachnid order Chelonethida*. Stanford University Press, Stanford. 284pp

- Cotton, T. J. & Braddy, S. J. 2004. The phylogeny of arachnamorph arthropods and the origin of the Chelicerata. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences*. 94, 169-193.
- Damen, W. G.M., Hausdorf, M., Seyfarth, E.-A., & Tautz, D. 1998. A conserved mode of head segmentation in arthropods revealed by the expression of Hox genes in a spider. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95, 10665-10670.
- Damen, W. G. M., Saridaki, T. & Averof, M. 2002. Diverse adaptations of an ancestral gill: A common evolutionary origin for wings, breathing organs, and spinnerets. *Current Biology*, 12, 1711-1716.
- de Pinna, M. G. G. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics*, 7, 367-394.
- Dencker, D. 1974. Das Skelettmuskelsystem von *Nymphon rubrum* Hodge, 1862 (Pycnogonida: Nymphonidae). *Zoologische Jahrbucher, Anatomie*, 93, 272-287.
- Dubinin, V.B., 1957. New system of the superclass Chelicerata. *Byulletin Moskovskoe Obshchestvo Ispytatelei Prirody, Otdel Biologicheskii*, 62, 25–33 [em Russo, com resumo em Inglês].
- Dunlop, J.A. 1996. Evidence for a sister group relationship between Ricinulei and Trigonotarbida. *Bulletin of British Arachnological Society*, 10, 193-204.
- Dunlop, J. A. 1999. A redescription of the Carboniferous arachnid *Plesiosiro madeleyi* Pocock, 1911 (Arachnida: Haptopoda). *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences*, 90, 29-47.
- Dunlop, J. A. 2000. The epistomal-labral plate and lateral lips in solifuges, pseudoscorpions and mites. *Ekológia (Bratislava)*, 19 (sup. 3), 67-78.

- Dunlop, J. A. 2002. Character states and evolution of the chelicerate claws. In: Toft, S. & Scharff, N, *European Arachnology 2000, Aarhus University Press, Århus*, 345-354.
- Dunlop, J. A., Anderson, L. I. & Braddy, S. J. 2004. A redescription of *Chasmataspis laurencii* Caster & Brooks, 1956 (Chelicerata: Chasmataspidida) from the Middle Ordovician of Tennessee, USA, with remarks on chasmataspid phylogeny. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences*, 94, 207-225.
- Dunlop, J. A. 2006. New ideas about the euchelicerate stem-lineage. In Deltchev, C. & Stoev, P. *European Arachnology 2005. Acta zoologica bulgarica, Suppl. 1*, 9–23
- Dunlop, J. A. & Alberti, G 2007. The affinities of mites and ticks: a review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46, 1-18.
- Dunlop, J. A. & Arango, C. P. 2005. Pycnogonid affinities: a review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43, 8-21.
- Dunlop, J. A., Kamenz, C. & Talarico, G. 2009. A fossil trigonotarbid arachnid with a ricinuleid-like pedipalpal claw. *Zoomorphology*. 128, 305-313.
- Dunlop, J. A. Penney, O. D., Tetlie, E. & Anderson, L. I. 2008. How many species of fossil arachnids are there? *Journal of Arachnology*, 36, 267-272.
- Dunlop, J. A., Tetlie, O. E., & Prendini, L. 2008. Reinterpretation of the Silurian Scorpion *Proscorpius osborni* (Whitfield): Integrating data from palaeozoic and recent scorpions, *Palaeontology*, 51, 303-320.
- Dunlop JA, Webster M. 1999. Fossil evidence, terrestrialization and arachnid phylogeny. *Journal of Arachnology*, 27, 86-93.
- Evans, G. O. 1992. *Principles of Acarology*. C.A.B. International, Wallingford, xviii + 563 pp.

- Fahrenbach, W. H. & Arango, C. P. 2007. Microscopic anatomy of Pycnogonida: II. Digestive System. III. Excretory System. *Journal of Morphology*, 268, 917-935.
- Farley, R. D. 2005. Developmental changes in the embryo, protonymph, and first molt of the scorpion *Centruroides vittatus* (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Morphology*, 265, 1-27.
- Firstman, B. F. 1973. The relationship of the cheliceral arterial system to the evolution of the endosternite. *Journal of Arachnology*, 1: 1-54.
- Foelix, R. F. 1985 Mechano- and chemoreceptive sensilla. In: Barth, F. G., *Neurobiology of arachnids*. Springer-Verlag, Berlin, 118-137.
- Fox, G. E., 2005. Non-canonical base pair database. Available at : <http://prion.bchs.uh.edu/>.
- Gillespie, J. J. 2004. Characterizing regions of ambiguous alignment caused by the expansion and contraction of hairpin-stem loops in ribosomal RNA molecules. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 936-943.
- Gillespie, J. J., Yoder, M. J. and Wharton, R. A. 2005. Predicted secondary structures for 28S and 18S rRNA from Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera: Apocrita): Impact on sequence alignment and phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution*, 61 (1), 114-137.
- Giribet, G. & Wheeler, W. 1999. On Gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 132-143.
- Giribet, G. 2001. Exploring the behavior of POY, a program for direct optimization of molecular data. *Cladistics*, 17, S60–S70.
- Giribet, G. 2007. Efficient tree searches with available algorithms. *Evolutionary Bioinformatics*, 3, 1-16.

- Giribet, G., & Ribera, C. 1998. The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9, 481-488.
- Giribet, G., 2003. Stability in phylogenetic formulations, and its relationship to nodal support. *Systematic Biology*, 52, 554-564.
- Giribet, G., Carranza, S., Baguña, J., Riutort, M., & Ribera, C. 1996. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Molecular Biology and Evolution*. 13, 76-84.
- Giribet, G., Edgecombe, G. D., Wheeler, W. C. & Babbitt, C. 2002. Phylogeny and systematic position of Opiliones: a combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics*, 18, 5-70.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S. & Nixon, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774-786.
- Gorab, E., Lacoba, M. G. de, & Botella, L. M. 1995. Structural constraints in expansion segments from a midge 26S rDNA. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 1016-1021.
- Grant, T., & Kluge, A. G., 2005. Stability, sensitivity, science, and heuristic. *Cladistics*, 21, 597-604.
- Gutell, R. R., Cannone, J. J., Shang, Z., Du, Y., & Serra, M. J. 2000. A Story: Unpaired Adenosine Bases in Ribosomal RNAs. *Journal of Molecular Biology*, 304, 335-354
- Gutell, R. R., Larsen, N. & Woese, C. R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 58, 10-26.

- Gutell, R. R., Lee, J. C. and Cannone, J.J. 2002. The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Current Opinions on Structural Biology*. 12, 301-310.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Halliday, R. B. 1998. *Mites of Australia, a Checklist and Bibliography*. CSIRO Publishing, Melbourne. 327pp.
- Harvey, M. S. 2002. The neglected cousins: what do we know about the smaller arachnid orders? *The Journal of Arachnology*, 30, 357-372.
- Harvey, M. S. 1992. The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). *Invertebrate Taxonomy*, 6, 1373-1435.
- Haupt, J. 2003. The Mesothelae – a monograph of an exceptional group of spiders (Araneae: Mesothelae). *Zoologica*, 154, 1-102.
- Hickson, R. E, Simon, C. & Perrey S. W. 2000. The Performance of Several Multiple-Sequence Alignment Programs in Relation to Secondary-Structure Features for an rRNA Sequence. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 530-539
- Hofacker I. L., Fekete M. & Stadler P. F. 2002. Secondary Structure Prediction for Aligned RNA Sequences. *Journal of Molecular Biology* , 319,1059-1066.
- Homman, H. 1985. Die Cheliceren der Araneae, Amblypygi und Uropygi mit den Skleriten, den Plagulae (Chelicerata, Arachnomorpha). *Zoomorphology*, 105, 69-75.
- Hou, X. & Bergström, J. 1997. Arthropods of the lower Cambrian Chengjiang fauna, southwest China. *Fossils and Strata*, 45, 1-116.

- Jeram, A. J. 2001. Paleontology. p. 370–392. In Brownell, P. & Polis, G. A. *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, Oxford, xiv + 431 pp.
- Jesionowska, K. 2003. Observations on the morphology of some eupodoid and endeostigmatic gnathosoma (Actinotrichida, Actinedida, Eupodoidea and Endeostigmata). *Acta zoologica cracoviensia*, 46, 257-268.
- Jordal, B., Gillespie, J. J. & Cognato, A. I. 2008. Secondary structure alignment and direct optimization of 28S rDNA sequences provide limited phylogenetic resolution in bark and ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae). *Zoologica Scripta*, 37, 43-56.
- Jow, H., Hudelot, C., Rattay, M. and Higgs, P. G. 2002. Bayesian phylogenetics using an RNA substitution model applied to early mammalian evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 1591-1601.
- Kamenz, C., Dunlop, J. A. Scholtz, G., Kerp, H. & Hass, H. 2008. Microanatomy of Early Devonian book lungs. *Biology Letters*, 4, 212–215.
- Kethley, J. 1990. Acarina: Prostigmata (Actinedida). In D. L. Dindal. *Soil Biology Guide*. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 667-756.
- King, P. E. 1973. *Pycnogonids*. Hutchinson of London. London, 144 pp.
- Kjer, K. M. 1995. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: An example of alignment and data presentation from the frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 314-330.
- Klann, A. E., Bird, T., Peretti, A. V., Gromov, A. V. & Alberti, G. 2009. Ultrastructure of spermatozoa of solifuges (Arachnida, Solifugae): Possible characters for their phylogeny? *Tissue and Cell*, 41, 91-103

- Klompen, H., Lekveishvili, M. & Black, W.C., IV. 2007. Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43, 936-951.
- Kluge, A. G. 2003. On the deduction of species relationships: a précis. *Cladistics*, 19, 233-239
- Kraus, O. 1976. Zur phylogenetischen Stellung und Evolution der Chelicerata. *Entomologica Germanica*, 3, 1-12.
- Lee, M. S. Y. 2001. Unalignable sequences and molecular evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 681-685.
- Lindquist, E. E. 1984. Current theories on the evolution of major groups of Acari and on their relationships with other groups of Arachnida, with consequent implications for their classification. In: Griffiths D. A., Bowman C. E., *Acarology VI*, Vol. 1. John Wiley & Sons, New York, 28-62.
- Manuel, M., Jager, M., Murienne, J., Clabaut, C., & Le Guyader, H. 2006. Hox genes in sea spiders (Pycnogonida) and the homology of arthropod head segments. *Development Genes and Evolution*, 216, 481-491.
- Masta, S. E., Longhorn, S. J., & Boore, J. L. 2008. Arachnid relationships based on mitochondrial genomes: Asymmetric nucleotide and amino acid bias affects phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 117-128
- Maxmen, A., Browne, W. E., Martindale, M. Q., & Giribet, G. 2005. Neuroanatomy of sea spiders implies an appendicular origin of the protocerebral segment. *Nature*, 437, 1144-1148.
- Michalik, P. & Alberti, G. 2005. On the occurrence of the 9+0 axonemal pattern in the spermatzoa of sheetweb spiders (Araneae, Linyphiidae). *Journal of Arachnology*, 33, 569-572.

- Mickevich, M. F., & Farris, J. S. 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Systematic Zoology*, 27, 143-158.
- Moore, R. A. Briggs, D. E. G. & Bartels, C. 2005. A new specimen of *Weinbergina opitzi* (Chelicerata: Xiphosura) from the Lower Devonian Hünsruck Slate, Germany. *Paläontologische Zeitschrift*, 79, 399-408.
- Murienne, J., Harvey, M. S. & Giribet, G. 2008. First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata) *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 170-184.
- Nagaswamy, U., Voss, N., Zhang, Z., & Fox, G. E., 2000. Database of noncanonical base pairs found in known RNA structures. *Nucleic Acids Research*, 28, 356-357.
- Norton, R. A., Kethley, J. B., Johnston, D. E. & OConnor, B. M. 1993. Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: Wrensch, D. L. & Ebbert, M. A. *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman & Hall, New York, 8-99.
- Nylander, J. A. A, Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. & Nieves-Aldrey, J. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined Data. *Systematic Biology*, 53, 47-67
- Orr, P. J., Siveter, D. J., Briggs, D. E. G., Siveter, D. J. & Sutton, M. D. 2000. A new arthropod from the Silurian Konservat–Lagerstätte of Herefordshire, England. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 1497–1504.
- Otto, J. & Wilson, K. 2001. Assessment of the usefulness of ribosomal 18S and mitochondrial COI sequences in Prostigmata phylogeny. In: Halliday, R. B., Walter, D. E., Proctor, H. C., Norton, R. A. & Colloff, M. J. *Acarology: Proceedings of the 10th International Congress*. CSIRO Publishing, Melbourne, 100-109.

- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- Prendini, L. 2001. Species or supraspecific taxa as terminals in cladistic analysis? Groundplans versus exemplars revisited. *Systematic Biology*, 50, 290-300.
- Punzo, F. 1998. *The biology of camel spiders*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4, disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reddell, J. R. & Cokendolpher, J. C. 1995. Catalogue, bibliography and generic revision of the order Schizomida (Arachnida). *Texas Memorial Museum Speleological Monographs*, 4, 1-170.
- Redelings, B. D. & Suchard, M. A. 2005. Joint Bayesian estimation of alignment and phylogeny. *Systematic Biology*, 54, 401-18.
- Rieppel, O. 2005. The philosophy of total evidence and its relevance for phylogenetic inference. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 45, 77-89.
- Rieppel, O. 2007. The nature of parsimony and instrumentalism in systematics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45, 177-183.
- Rix, M, Harvey, M & Roberts, J. 2008. Molecular phylogenetics of the spider family Micropholcommatidae (Arachnida: Araneae) using nuclear rRNA genes (18S and 28S). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 1031-1048.
- Roewer, C-F. 1934. Solifugae, Palpigradi. *Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreich*. 5: IV, 4, 1-713.
- Rowland, J.M., & Cooke, J. A. L. 1973. Systematics of the arachnid order Uropygida (=Thelyphonida). *Journal of Arachnology*, 1, 55-71.

- Savill, N., Hoyle, D. & Higgs, P. 2001. RNA sequence evolution with secondary structure constraints: Comparison of substitution rate models using maximum likelihood methods. *Genetics*, 157, 399-411.
- Schnare, M. N., Damberger, S. H., Gray, M. W. & Gutell, R. R., 1996. Comprehensive comparison of structural characteristics in eukaryotic cytoplasmic large subunit (23S-like) ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology*, 256, 701-719.
- Scholl, G. 1977. Beitrage zur Embryonalentwicklung von *Limulus polyphemus* L. (Chelicerata, Xiphosura). *Zoomorphologie*, 86, 99-154.
- Scholtz, G., & Kamenz, C. 2006. The book lungs of Scorpiones and Tetrapulmonata (Chelicerata, Arachnida): Evidence for homology and a single terrestrialisation event of a common arachnid ancestor. *Zoology*, 109, 2-13.
- Selden, P. A., Shear, W. A. & Sutton, M. 2008. Fossil evidence for the origin of spider spinnerets, and a proposed arachnid order. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 20781-20785
- Selden, P. A. 1981. Functional morphology of the prosoma of *Baltoerypterus tetragonophthalmus* (Fisher) (Chelicerata: Eurypterida) *Transactions of the Royal Society of Edimburgh: Earth Sciences*, 72, 9-48.
- Selden, P. A., Shear, W. A., & Bonamo, P. M. 1991. A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae. *Palaeontology*, 34, 241-281.
- Shatrov, A. B. 2005 Ultrastructural investigations of the salivary glands in adults of the microtrombidiid mite *Platytrombidium fasciatum* (C. L. Koch, 1836) (Acariformes: Microtrombidiidae). *Arthropod Structure & Development*, 34, 49-61.

- Shear W. A., Selden, P. A., Rolfe W. D. I, Bonamo, P. M., Grierson, J. D. 1987. New terrestrial arachnids from the Devonian of Gilboa, New York (Arachnida, Trigonotarbida). *American Museum Novitates*, 2901,1-74.
- Shultz, J. W. 1989. Morphology of locomotor appendages in Arachnida: evolutionary trends and phylogenetic implications. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 97, 1-56.
- Shultz, J. W. 1990. Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics*, 6, 1-38.
- Shultz, J. W. 1993. Muscular anatomy of the giant whipscorpion, *Mastigoproctus giganteus* (Arachnida, Uropygi), and its evolutionary significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 108, 335-365.
- Shultz, J. W. 1999. Muscular anatomy of a whipspider, *Phrynus longipes* (Amblypygi), and its evolutionary significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 126, 81-116.
- Shultz, J. W. 2000. Skeletomuscular anatomy of the harvestman *Leiobunum aldrichi* (Weed, 1893) (Arachnida: Opiliones: Palpatores) and its evolutionary significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128, 401-438.
- Shultz, J. W. 2001. Gross muscular anatomy of *Limulus polyphemus* (Xiphosura, Chelicerata) and its bearing on evolution in the Arachnida. *The Journal of Arachnology*, 29, 283-303.
- Shultz, J. W. 2007a. A phylogenetic analysis of the arachnid orders based on morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150, 221-265.

- Shultz, J. W. 2007b. Morphology of the prosomal exoskeleton of Scorpiones (Arachnida) and a new hypothesis for the evolution of cuticular cephalic endoskeletons in arthropods. *Arthropod Structure & Development*, 36, 77-102.
- Shultz, J. W. & Pinto da Rocha, R. 2007. Morphology and functional anatomy. In: Pinto da Rocha R, Machado G, Giribet G, *The harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, 14-61.
- Simmons, M. P. 2004. Independence of alignment and tree search. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 874-879
- Simonnet, F., Célérier, M.-L., & Quénec, E. 2006. *Orthodenticle* and *empty spiracles* genes are expressed in a segmental pattern in chelicerates. *Development, Genes and Evolution*, 216, 487-480.
- Snodgrass, R. E. 1948. The feeding organs of Arachnida, including mites and ticks. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 110 , 1-93.
- Storch, V., Alberti, G. & Ruhberg, H. 1979. Light and electron microscopical investigations on the salivary glands of *Opisthopatus cinctipes* and *Peripatopsis mosleyi* (Onychophora: Peripatopsidae). *Zoologischer Anzeiger*, 203, 35-47.
- Stürmer, W & Bergström, J. 1981. *Weinbergina*, a xiphosuran arthropod from the Devonian Hunsrück Shale. *Paläontologische Zeitschrift*, 55, 237-255.
- Sutton, M. D., Briggs, D. E. G, Siveter, D. J., Siveter, D, J & Orr, P. J 2002. The arthropod *Offacolus kingi* (Chelicerata) from the Silurian of Herefordshire, England: computer based morphological reconstructions and phylogenetic affinities. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 269, 1195–1203.

- Swain, T. D. & Taylor, D. J. 2003. Structural rRNA characters support monophyly of raptorial limbs and paraphyly of limb specialization in water fleas. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270, 887-896
- Talarico, G., Palacios-Vargas, J. G., Fuentes-Silva, M. & Alberti, G. 2005. First ultrastructural observations of the tarsal pore organ of *Pseudocellus pearsei* and *P. boneti* (Arachnida, Ricinulei). *Journal of Arachnology*, 33, 604-612.
- Telford, M. J. & Thomas, R. H. 1998. Expression of homeobox genes show chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 10671-10675.
- Thomas, R. H. & Telford, M. J. 1999. Appendage development in embryos of the oribatid mite *Archegozetes longisetosus* (Acari, Oribatei, Trhypochthoniidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), 80, 193-200
- Van der Hammen, L. 1977. A new classification of Chelicerata. *Zoologische Mededelingen*, 51, 307-319
- Van der Hammen, L. 1979. Comparative studies in Chelicerata. I. The Cryptognomae (Ricinulei, Architarbi and Anactinotrichida). *Zoologische Verhandelingen*, 174, 1-62
- Van der Hammen, L. 1982. Comparative studies in Chelicerata. II. Epimerata (Palpigradi and Actinotrichida). *Zoologische Verhandelingen*, 196, 1-70.
- Van der Hammen, L. 1989. *An introduction to comparative arachnology*. SPB Academic Publishing, Leiden, 576 pp.
- Varón, A., Vinh, L. S., Bomash, I. & Wheeler, W. C. 2007. POY 4.0 Beta 2398. American Museum of Natural History.
<http://research.amnh.org/scicomp/projects/poy.php>

- Vilpoux, K. & Waloszek, D. 2003. Larval development and morphogenesis of the sea spider *Pycnogonum litorale* (Ström, 1762) and the tagmosis of the body of Pantopoda. *Arthropod Structure and Development*, 32, 349-383.
- Vogt, L. 2008. The unfalsifiability of cladograms and its consequences. *Cladistics*, 24, 62-73.
- Walossek, D. & Müller, K. J. 1998. Cambrian 'Orsten'-type arthropods and the phylogeny of Crustacea. In Fortey, R. A. & Thomas, R. H. *Arthropod Relationships*. The Systematics Association Special Volume. Chapman & Hall, London, 139-153.
- Walter, D. E. & Proctor, H. C. 1998. Feeding behaviour and phylogeny: observations on early derivative Acari. *Experimental & Applied Acarology*, 22, 39-50
- Weygoldt, P. 1969. *The Biology of Pseudoscorpions*. Harvard University Press, Cambridge, 145 pp.
- Weygoldt, P. 1978. Paarungsverhalten und Spermatophorenmorphologie bei Geißelskorpionen: *Thelyphonellus amazonicus* Butler und *Typopeltis crucifer* Pocock (Arachnida, Uropygi). *Zoomorphologie*, 89, 145-156.
- Weygoldt, P. 1998. Evolution and systematics of the Chelicerata. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 63-79.
- Weygoldt, P. 2000. *Whip spiders (Chelicerata: Amblypygi). Their Biology, Morphology and Systematics*. Apollo Books, Stenstrup, 163 pp.
- Weygoldt, P. & Paulus, H.F. 1979. Untersuchungen zur Morphologie, Taxonomie und Phylogenie der Chelicerata. 2. Cladogramme und die Entfaltung der Chelicerata. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionforschung*, 17, 177-200.
- Wheeler, W. C. 1995. Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Systematic Biology*, 44, 321-331.

- Wheeler, W.C., 1996. Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics*, 12, 1-9.
- Wheeler, W. C., Aagesen, L., Arango, C. P., Faivovich, J., Grant, T., D'Haese, D., Janies, D., Smith, W. L., Varon, A. & Giribet, G. 2006. *Dynamic homology and phylogenetic systematics: a unified approach using POY*. 1. ed. New York: American Museum of Natural History, 365 p.
- Wheeler, W. C., Giribet, G. 2009. Phylogenetic hypotheses and the utility of multiple sequence alignment. In: Rosenberg, M. (Ed.) *Perspectives on Biological Sequence Alignment*. University of California Press, Berkeley.
- Wheeler, W. C. & Hayashi, C. Y. 1998. The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics*, 14, 173–192.
- Wheeler, W.C. & Honeycutt, R.L. 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: Evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology Evolution*, 5, 90-96.
- Whiting, M. F., Carpenter, J. M., Wheeler, Q. D., & Wheeler, W. C. 1997. The Strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46, 1-68.
- Wills, M. A, Briggs, D. E. G., Fortey, R. A., Wilkinson, M. & Sneath, P. H. A. 1998. An arthropod phylogeny based on fossil and recent taxa. In Edgecombe, G. D. *Arthropod fossils and phylogeny*, Columbia University Press, New York, 33-105..
- Winkler, D. 1957. Die Entwicklung der äusseren Körpergestalt bei den Phalangiidae (Opiliones). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 33, 355-389.
- Wortley, A. H. & Scotland, R. W. 2006. The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 55, 677-685

- Wuyts, J., De Rijk, P., Van de Peer, Y., Pison, G., Rousseeuw, P., & De Wachter, R. 2000. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA, *Nucleic Acids Research*, 28, 4698-4708.
- Wuyts, J., Perrière G. & Van de Peer, Y. 2004. The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research*, 32, D101-D103
- Yoshikura, M. 1975. Comparative embryology and phylogeny of Arachnida. *Kumamoto Journal of Science, Biology*, 12, 71-142.
- Zacharda, M. 1980. Soil mites of the family Rhagidiidae (Actinedida: Eupodoidea), morphology, systematics, ecology. *Acta Universitatis Carolinae Biologica*, 5-6 (1978), 489-785.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31, 3406-3415.

2.6. Enunciados dos caracteres constantes da “matriz A”

Região cefálica ou prossoma

1. *Número de segmentos inclusos no escudo cefálico* (0 = cinco (cefalossoma/proterossoma); 1 = sete (carapaça)).

Este caráter refere-se ao número de segmentos posteriores ao ácron (ou todos os elementos da cabeça, caso o ácron não exista) inclusos sob o esclerito prosomal anterior. Pycnogonida e alguns Arachnida (em particular Actinotrichida entre os ácaros, Solifugae, Palpigradi e Schizomida), parecem reter o número de segmentos cefálicos considerado primitivo para os Euarthropoda *sensu* Walossek & Müller (1998). Considera-se aqui a ranhura sejugal e a separação entre as coxas das duas pernas anteriores e as duas posteriores como evidência desse tagma em Actinotrichida. Isso engloba o caráter 7 da matriz de Shultz (2007a), relacionado a presença ou ausência de linhas demarcatórias entre *pro-*, *meso-* e *metapeltidium* neste caráter. A escolha de codificar o estado 1 como “sete ou mais segmentos” está relacionado ao observado em Xiphosura, em que a carapaça parece ter incorporado o primeiro segmento opistossomal e possivelmente parte do oitavo (veja abaixo).

2. *Cristas oftálmicas* (0 = ausente; 1 = presente)

As espécies viventes de Xiphosura apresentam um par de cristas longitudinais próximo à região dos olhos laterais. Estruturas similares ocorrem em Plesiosiro (Dunlop, 1999) e Thelyphonida, exceto por Hypoctoninae (*Mastigoproctus*: Rowland & Cooke, 1973).

3. *Aba pleural da carapaça* (0 = ausente; 1 = presente).

O amplo escudo cefálico dos Xiphosura, com sua larga aba pleural, é tradicionalmente considerada como plesiomórfica em relação aos aracnídeos, dado a condição similar observada em Trilobita e outros Arachnomorpha (e.g. Shultz, 1990, caráter 2; Shultz, 2001, caráter 1). Quando Pycnogonida é utilizado, como grupo externo, essa característica é alternativamente otimizada como derivada.

4. *Lobo cardíaco* (0 = ausente; 1 = presente).

Os Xiphosura recentes expressam um lobo cardíaco, isto é, uma região posterior medial da carapaça em relevo, justamente onde se aloja o vaso dorsal. Essa característica é observada em várias espécies fósseis como *Weinbergina*, Eurypterida e *Chasmataspis*.

5. *Glândulas repugnatórias no prossoma* (0 = ausente; 1 = presente).

A presença dessas glândulas nos opiliões é considerada como uma das mais convincentes apomorfias da ordem; e.g. Giribet *et al.* (2002, caráter 12).

6. *Cucullus* (0 = ausente; 1 = presente).

Esta característica, única dos Ricinulei, consiste em uma placa articulada com o prossoma que cobre as partes bucais.

7. *Região esternal* (0 = amplo, coxas bem separadas; 1 = estreito anteriormente; 2 = estreito posteriormente; 3 = estreito, coxas encontram-se medialmente).

Independente do esterno estar presente ou não, quelícerados variam quanto ao grau que as coxas estão consolidadas medialmente. A codificação aqui empregada segue a de Shultz (2007a, caráter 12), exceto que a área esternal dos ácaros Actinotrichida deve ser considerada como apresentando o estado três (cf. Alberti, 2006). Seguindo Shultz

(2007a), consideramos o encontro medial das coxas propriamente ditas e não seus enditos ou gnatobases. A presença ou ausência de gnatobases é codificada em outro caráter.

8. *Esterno prossomal* (0 = inteiro; 1 = dividido).

Os esternos de Palpigradi, Amblypygi, Uropygi e Schizomida são divididos em múltiplos escleritos. Outros aracnídeos que possuem um esterno, apresentam-no como um esclerito único e indiviso. Não aplicável a táxons sem um esterno.

9. *Dobra cefálica* (0 = ausente; 1 = presente).

Em muitas trilobitas e outros Arachnomorpha, o escudo cefálico continua ventralmente como uma dobra, característica claramente presente também em Xiphosura. Dobras da carapaça sobre si mesma aparecem em Telyphonida e Trigonotarbida. Esse caráter é por isso codificado como ambíguo para o primeiro.

Boca e faringe

10. *Proboscis* (0 = ausente; 1 = presente).

A proboscis apresenta seção triangular internamente e termina na boca em formato de Y (Dencker 1974). É uma autapomorfia de Pycnogonida (e.g. Weygoldt & Paulus 1979, caráter 58). Tentativas de homologizar a proboscis dos Pycnogonida com as partes bucais dos quelícerados provaram-se inúteis (Dunlop & Arango, 2005), suportando a sua interpretação como uma adaptação alimentar única desse grupo.

11. *Boca* (0 = dirigida anteroventralmente; 1 = dirigida posteroventralmente).

A boca dos Xiphosura dirige-se para traz, em direção às gnatobases. Essa condição tem sido interpretada como plesiomórfica para os quelícerados. Muitos fósseis parecem possuir uma flexão similar do tubo digestivo, como por exemplo, as Trilobitas, como indicado pela flexão dirigida para traz do hipostômio ou do conteúdo fossilizado do tubo digestivo. Aqui codifica-se os Pycnogonida como 0/1, uma vez que a orientação da boca varia conforme a da proboscis, o que obscurece esse caráter (veja acima).

12. *Lábio/tritosterno* (0 = ausente; 1 = presente).

O lábio ou tritosterno em algumas terminologias é um esclerito separado, geralmente formando o lábio inferior da boca. Shultz (2007a) considerou o lábio uma estrutura presente em Palpigradi, Araneae, Amblypygi, Telyphonida, Schizomida, Trigonotarbida, Ricinulei, e em alguns ácaros Anactinotrichida. De fato, o lábio dos Palpigradi não compartilha a mesma posição relativa observada em outros aracnídeos. Estudos tradicionais da morfologia desses animais consideram o “lábio” nos Palpigradi como um protosternum, i.e. como um esclerito associado ao segmento da quelícera e não imediatamente anterior à perna I (Snodgrass, 1948, Börner, 1902). Palpigradi é, portanto, codificado como zero para esse caráter. Pseudoscorpiones e Solifugae possuem um esclerito estreito relacionado dorsalmente a processos das coxas do palpo. Nos pseudoescorpiones, ele é conhecido como lofognato e possui uma crista dorsal que se encaixa em uma fenda na superfície ventral da placa epistomolabral, ou trofognato (Snodgrass, 1948). Um esclerito similar pode ser encontrado em alguns Endeostigmata, como *Alycus ornithorhyncus* Grandjean, 1937, e *Orthacarus tremli* Zachvatkin, 1949 (Bimichaelidae) (Jesionowska, 2003). Devido à sua posição, estes escleritos são considerados como de origem deuto- ou protosternal e dessa forma não homólogos ao lábio como definido aqui. Por um motivo similar, foi excluído o “lábio” presente nos

opiliões, exceto Cyphophthalmi. Aqui considerados como extruturas associadas à perna I e não ao palpo (Shultz & Pinto-da-Rocha, 2007, Winkler, 1957).

13. *Placa Epistomal-labral* (0 = ausente; 1 = presente).

O labro é fusionado ao epistômio em Solifugae, Pseudoscorpiones e nos dois grupos de ácaros (Snodgrass, 1948, *contra* Shultz, 2007a). A estrutura inteira projeta-se consideravelmente entre as quelíceras e é flanqueada por um par dos chamados lábios laterais (van der Hammen, 1989; Dunlop, 2000). A placa e os lábios laterais são aqui codificados como um único caráter complexo. A placa é chamada algumas vezes de “bico” ou “rosto”, especialmente na literatura referente à ordem Solifugae.

14. *Limite ventroposterior da câmara pré-oral* (0 = formado pelo tritosterno; 1 = formado pelas coxas do palpo).

Esta morfologia específica da câmara pré-oral foi proposta por Shultz (1999, caráter 5) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi (= Uropygi + Amblypygi). Essa condição em aracnídeos sem um lábio (Caráter 12) não foi discutida e esses táxons são codificados como ambíguos (?). Isto sublinha problemas com vários caracteres esqueleto-musculares, cuja homologia dificilmente é passível de ser determinada em todas as ordens de aracnídeos.

15. *Estomateca* (0 = ausente; 1 = presente).

Este caráter foi definido por Shultz (2000) como uma câmara pré-oral formada pelas laterais da coxa do palpo e, ventralmente, por extensões das coxas das pernas I e, em menor grau, das pernas II. Shultz tratou esse caráter como uma sinapomorfia unindo

Scorpiones e Opiliones, apesar de ser criticada (e.g. Weygoldt 1998), porque a estomateca está ausente em algumas famílias de escorpiões fósseis.

16. *Ingestão de material sólido* (0 = ausente; 1 = presente).

Digestão extraintestinal é tipicamente considerada como uma apomorfia dos aracnídeos.

Xiphosura não apresenta nenhuma evidência de digestão extraoral e seu estômago muscular é adaptado à maceração de material sólido. Não existe evidência para sua ocorrência em artrópodes fósseis não-aracnídeos, e é comum observar sedimento (Hou & Bergström, 1997) ou mesmo partes duras de presas (e.g. *Sidneyia*, Bruton, 1981) entre os restos de intestinos fósseis desses animais. Pycnogonida, por outro lado, apresenta um filtro faringeal formado por numerosas setas, que certamente impedem a passagem de partículas de tamanho maior que subcelular (King, 1973; Fahrenbach & Arango, 2007). Fahrenbach & Arango (2007) também descreveram de 180 a 220 pequenas glândulas salivares nas bordas anterior dorsal e ventral da proboscis de *Ammonothea hilgendorfi*, sugerindo que os Pycnogonida apresentam digestão pré-oral. No entanto, devemos notar que os Pycnogonida possuem uma dieta muito especializada e dessa maneira o grupo é codificado como incerto para esse caráter. Vários opiliões e alguns ácaros (Opiliacarida, Oribatida, alguns Endeostigmata e Astigmata de vida livre, Walter & Proctor, 1998) consomem partículas sólidas de alimento, apesar de possuírem uma câmara pré-oral bem desenvolvida e certo grau de digestão pré-oral. Os demais aracnídeos alimentam-se de material exclusivamente líquido, digeridos parcialmente na câmara pré-oral e frequentemente possuem aparatos filtradores (veja o caráter 17 abaixo) a fim de impedir a entrada de material particulado; e.g. Giribet *et al.* (2002, caráter 218). Vale notar que para parte dos escorpiões paleozóicos, esse caráter é incerto, já que eles não possuíam uma câmara pré-oral desenvolvida.

17. *Placa palatal* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa modificação específica da superfície interna dorsal da faringe, com fileiras de pequenas placas usadas para filtrar material particulado do produto da digestão pré-oral é considerada uma sinapomorfia das aranhas; e.g. Giribet *et al.* (2002, caráter 159).

18. *Esqueleto epistomal com três ramos* (0 = ausente; 1 = presente).

Esta característica do esqueleto epistomal, que porta três processos para a inserção dos músculos dilatadores da faringe, foi descrita em detalhes por Shultz (2000), tendo sugerido-a como uma possível apomorfia de escorpiões e opiliões.

19. *Esclerito epifaringeal* (0, ausente; 1, presente).

A codificação segue Shultz (2007a, caráter 191).

20. *Esclerito epifaringeal grande, projetado posteriormente* (0, ausente; 1, presente; -, inaplicável devido à ausência desse esclerito (19)).

A codificação segue Shultz (2007a, caráter 192).

Segmentação, tagmose e télson

21. *Metassoma* (0 = ausente; 1 = presente).

Cotton & Braddy (2004) definiram esse caráter como um “pós-abdome desprovido de apêndices”. Essa definição é difícil de aplicar para os aracnídeos com apêndices abdominais irreconhecíveis (e.g. Palpigradi, Opiliones, Pseudoscorpiones, Acari).

Procurou-se aqui redefinir esse caráter relacionado à tagmose como um conjunto de

segmentos próximo à extremidade posterior do animal, tipicamente com exoesqueleto cilíndrico e distinguível do restante do opistossoma por um estreitamento do corpo. É considerado presente em Xiphosura, apesar de obscurecido pela fusão dos segmentos do opistossoma.

22. *Comprimento do metassoma* (0 = três segmentos; 1 = cinco segmentos).

Caráter inaplicável para grupos que não expressam um metassoma. Dentre os grupos vivos, apenas os escorpiões apresentam o estado 1.

23. *Télson pós-anal bem desenvolvido* (0 = ausente; 1 = presente).

Dado que vários grupos fósseis de artrópodes não-quelicerados apresentam um télson pós-anal, a presença dessa estrutura em Xiphosura, Scorpiones, Palpigradi, Telyphonida e Schizomida deve ser uma simplesiomorfia. Nenhum Pycnogonida vivo possui um télson, mas alguns representantes fósseis, como *Palaeisopus*, apresentam um télson bem desenvolvido (Vilpoux & Waloszek, 2003); ver também Walossek & Müller (1998), para discussões relacionadas ao plano corpóreo desses animais.

24. *Télson flageliforme* (0 = ausente; 1 = presente).

Nos Palpigradi, Telyphonida e, ainda que consideravelmente modificado, Schizomida, dentre as ordens viventes de aracnídeos, e Uraraneida, entre as ordens fósseis, o télson é subdividido em múltiplos artículos, formando uma estrutura em forma de flagelo.

Caráter inaplicável a grupos que não possuem um télson (caráter 23).

25. *Télson com glândulas de veneno* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa característica é considerada como uma autapomorfia dos escorpiões.

26. *Télson especializado para o comportamento sexual dos machos* (0 = ausente; 1 = presente).

Em Schizomida, o télson flageliforme modificado dos machos cumpre um papel importante durante a corte. A fêmea segura o flagelo do macho e é puxada em direção ao espermatóforo. Isso é considerado como uma autapomorfia do grupo.

Quelíceras ou apêndices deutocerebrais

27. *Número de artículos da quelícera* (0 = três; 1 = dois).

Solifugae, Pseudoscorpiones, Ricinulei e Tetrapulmonata apresentam apenas dois artículos na quelícera. Isto é amplamente aceito como apomórfico, se comparado aos três artículos encontrados nas demais ordens de Euchelicerata e nos Pycnogonida. Se a presença de dois artículos resultou da redução do artículo proximal ou de sua fusão ao segundo artículo, ou se surgiu da mesma maneira em todas as ordens com quelícera formada por dois artículos, não se sabe. Por essa razão, Acariiformes é codificado como possuindo dois artículos. Aqueles que suportam a opinião que a região proximoventral do dígito fixo desse grupo é produto da redução e fusão do artículo proximal baseiam-se na inserção do músculo retrator da quelícera nessa região (Evans, 1992). Aqui se considera tal argumento insuficiente para considerar as quelíceras dos Acariiformes formadas por três artículos, já que se espera que o músculo retrator da quelícera se insira em algum ponto após a perda do artículo proximal.

Ao menos uma espécie de Pycnogonida foi descrita com quelíforos compostos por quatro segmentos (Dunlop & Arango, 2005), mas o significado dessas observações não

é claro. Todos os Pycnogonida empregados nas análises possuem quelíforos com três segmentos.

28. *Posição da apotele da quelícera* (0 = ventral; 1 = dorsal; 2 = lateral).

Nos Solifugae, Pseudoscorpiones e nos dois principais grupos de ácaros, a apotele da quelícera articula-se ventralmente ao dígito fixo (e.g. Dunlop 2000). Nos Tetrapulmonata e Ricinulei, a apotele articula-se dorsalmente (lembrando a torção sofrida na linhagem que leva às aranhas labidognatas). Quelíceras com três segmentos em que o dígito móvel se articula lateralmente devido, na verdade, à forma da articulação entre o artículo proximal e o dígito fixo, não são diretamente acomodáveis nessas duas categorias. Aí se incluem picnogonídeos, xifosuros, escorpiões, opiliões e palpiígrados, aos quais é atribuído o estado de caráter “2”.

29. *Dígito móvel da quelícera* (0 = quelado; 1 = “tipo canivete”; 2 = estiliforme ou do tipo ‘*Anystys*’).

A forma conhecida em inglês como ‘*clasp-knife*’ ou seja, “canivete”, *sensu* Shear *et al.* (1987), em que a apotele forma algo que se assemelha mais a uma presa que ao dígito móvel de uma quela é encontrada em Tetrapulmonata (Araneae, Amblypygi, Telyphonida e Schizomida) e na ordem extinta Trigonotarbida (veja também Kraus, 1976). As quelíceras de Ricinulei aproximam-se dessa condição (veja e.g., Dunlop, 1996, fig. 11), com uma longa “presa” articulando-se contra os dentes do dígito fixo; tal condição é codificada aqui como 0/1. Muitos Prostigmata também apresentam o dígito fixo reduzido, mas o dígito móvel se articula ventralmente, de forma que a condição apresentada pelo grupo é claramente não homóloga à condição observada nos Tetrapulmonata e Ricinulei; é codificada separadamente aqui.

30. *Dígito móvel desprovido de setas e não serrilhado* (0 = ausente; 1 = presente).

Selden *et al.* (1991) sugeriram que a perda de setas e qualquer sorte de projeções no dígito móvel das aranhas seriam uma sinapomorfia desse grupo. Selden *et al.* (1991, 2008) demonstraram que essa condição também ocorre na forma fóssil *Attercopus*; isto é, que esse caráter suportaria um clado formado por (Uraraneida + Araneae). A presa (ou dígito móvel) é setosa ou dentada em outros aracnídeos. A condição observada em alguns ácaros não é considerada como primariamente homóloga àquela observada aqui.

31. *Plagula ventralis* (0 = ausente, 1 = presente).

Esse pequeno esclerito entre a presa e o segmento basal da quelícera foi proposto como uma sinapomorfia das ordens Araneae, Amblypygi, Uropygi e Schizomida; cf. Homman (1985).

32. *Glândulas de veneno no dígito móvel da quelícera* (0 = ausente; 1 = presente).

Tradicionalmente apresentado como uma sinapomorfia de aranhas, glândulas de veneno abrindo-se nas presas da quelícera estão certamente presentes em todas as aranhas inclusas neste trabalho, com exceção das Mesothelae (*Liphistius*), que são geralmente tidas como as mais basais dentre as aranhas viventes (Haupt, 2003). Glândulas de veneno também estão ausentes nas aranhas Uloboridae. Se a ausência observada nas Mesothelae viventes reflete o estado ancestral das aranhas ou é uma perda posterior está por ser resolvido.

33. *Aparato endocefálico para produção de teia* (0 = ausente; 1 = presente).

O aparato para produção de teia, junto com fiandeiras e gálea associadas às quelíceras é uma importante autapomorfia dos pseudoscorpídeos (e.g. Harvey 1992). Essas glândulas, que também se abrem no dígito móvel das quelíceras (Weygoldt 1969), aparentemente não são homólogas às glândulas de veneno das aranhas.

34. *Flagelo na quelícera* (0 = ausente; 1 = presente).

Esta projeção da superfície dorsal da quelícera dos Solifugae machos, às vezes bastante complexa, pode tomar um grande número de formas, mas é ausente na família Eremobatidae (Punzo 1998). Sua função precisa nos solífugos não é bem entendida. O caráter tem sido tratado como uma autapomorfia para a ordem, porém Harvey (1992) considerou o flagelo como uma possível sinapomorfia de Solifugae e Pseudoscorpiones (veja, por exemplo, Weygoldt 1969, fig. 2), o que é aceito aqui. Note que o flagelo presente no dígito fixo não deve ser confundido com a gálea, que se encontra no dígito móvel (veja o caráter anterior).

35. *Articulação quelícera-carapaça* (0 = ausente; 1 = presente).

A articulação entre o segmento proximal das quelíceras através de um processo lateral da carapaça, tem sido descrita para os Solifugae e a maioria dos Pseudoscorpiones, e sugerida como uma possível sinapomorfia ligando os dois grupos (veja, por exemplo, Shultz (1990, caráter 13).

36. *Fusão medial da quelícera* (0 = ausente; 1 = quelícera fusionada medialmente).

A fusão medial dos segmentos proximais das quelíceras entre si é encontrada nos Prostigmata Tetranychoidae, Raphignathidae, Caligonellidae, Tarsonemina e em alguns

Tydeidae e Stigmaeidae (Evans, 1992). Um arranjo similar ocorre em algumas aranhas, como as Filistatidae, mas não entre as aranhas incluídas neste trabalho.

37. *Dígito móvel* (0 = tipo ‘*Anystis*’; 1 = estiliforme).

Entre os ácaros Acariformes que perderam o dígito fixo, podemos distinguir duas condições. A primeira, refere-se ao dígito móvel mais ou menos curvado e serrilhado das famílias Trombidiidae, Halacaridae (maior parte), Trombiculidae, Anystidae, Caeculidae e Paratydeidae. Por outro lado, os dígitos móveis são lineares e lisos nos Erythraeidae, Smariididae, Cheyletidae e Tetranychidae. Esse caráter é aplicável apenas para ácaros sem dígito fixo em suas quelíceras (caráter 29, estado 2).

Palpos ou apêndice tritocerebral

38. *Coxas do palpo* (0 = livre; 1 = medialmente fusionadas).

Caráter problemático, pois é potencialmente parte do caráter seguinte, ou seja, a presença de um gnatossoma nos dois grupos de ácaros e talvez em Ricinulei.

Independente da presença de um gnatossoma, a fusão medial das coxas dos palpos ocorre também nas ordens Telyphonida e Schizomida. . O resultado de tal fusão é conhecido como camerostoma. (veja, por exemplo, Yoshikura (1975, tabela 24) e Shultz (1990: caráter 18).

39. *Gnatossoma* (0 = ausente; 1 = presente).

O gnatossoma essencialmente consiste das coxas fundidas dos palpos (veja o caráter anterior), o que forma o subcapítulo, acrescido das quelíceras, lábios laterais da boca, placa epistomolabral e faringe. Todas essas estruturas formam uma unidade distinta do

restante do corpo. O gnatossoma tem sido considerado uma das mais convincentes sinapomorfias de Acari (e.g. Lindquist 1984), apesar de sua homologia ter sido desafiada por van der Hammen (1989), que notou significativas diferenças nos padrões de inserção muscular (veja também Alberti, 2006). Ao mesmo tempo, alguns autores também reconhecem o gnatossoma como presente em Ricinulei; assim, essencialmente o mesmo caráter tem sido utilizado por diferentes autores para suportar Acari como um grupo monofilético e para associá-lo a Ricinulei. Considerou-se aqui a segunda interpretação problemática e seguiu-se Shultz (2007a) ao se codificar o gnatossoma como presente nos dois grupos de ácaros e como desconhecido (?) para Ricinulei.

40. *Rutela* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa espessa seta modificada é encontrada nos membros basais de Anactinotrichida e Actinotrichida, entre os ácaros, mas ausente nos Anactinotrichida Holthryrida e Ixodida, e frequentemente citadas como ausentes nos ácaros prostigmatas. Eles foram indicados como presentes em Rhagidiidae por Zacharda (1979), apesar das estruturas observadas nos espécimes aqui examinados dessa família não se parecerem com as encontradas em Oribatida ou Opilioacarida. Independente das reversões dentro de cada uma das linhagens de ácaros, a rutela parece ser a mais convincente apomorfia suportando o monofiletismo de Acari (Lindquist 1984, caráter 1). Alberti (2006, e referências por ele citadas) tem, no entanto, questionado a homologia da rutela nos dois grupos de ácaros.

41. *Quela do palpo* (0 = ausente, palpo similar a uma perna locomotora; 1 = sub-raptorial; 2 = quelado, quela formada pela apotele e tarso; 3 = quelado, quela formada pelo tarso e tibia; 4 = complexo “unha-dedão”).

Grandes palpos sub-raptorais caracterizam Amblypygi, Telyphonida e Schizomida. Os palpos ou apêndices equivalentes de Xiphosura, Ricinulei e ao menos *Palaeocharinus*, dentre os Trigonotarbida, terminam em uma garra ou pinça em que a apotele se opõe a uma projeção formada pelo tarso. Escorpiões e pseudoescorpiões compartilham uma quela formada pelo tarso, que se opõe à tibia (Shultz, 1990, caracteres 16 e 17; Shultz, 1999, caráter 11). Muitos ácaros possuem uma forte “garra” medial na tibia do palpo, que se move contra o tarso. Esse complexo ‘unha-dedão’, como é conhecido no jargão acarológico, é visto em Tetranychoida, Stigmaeidae, Cheyletidae, Parasintegona terrestres, Erythreaoidea, Caeculidae e Anystidae, dentre os clados amostrados aqui.

42. *Órgão limpante no palpo* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa “escova” composta por duas fileiras altamente organizadas de setas tem sido considerada como uma das poucas apomorfias explícitas de Amblypygi (Shear *et al.* 1987).

43. *Glândulas de veneno no palpo* (0 = ausente; 1 = presente).

Glândulas de veneno no palpo – que podem abrir em um ou nos dois dígitos (Weygoldt 1969) – representam uma convincente apomorfia do grupo dos pseudoescorpiões Iocheirata *sensu* Harvey (cf. Harvey, 1992; Muriénne *et al.* 2008). Mas deve-se reiterar que a presença de glândulas de veneno no pedipalpo dos pseudoescorpiões não é uma apomorfia compartilhada por todos os membros da ordem.

44. *Apotele do palpo* (0 = diferenciada do tarso; 1 = não diferenciada do tarso).

Apesar de proposta por Shultz (1999, caráter 14) como uma possível apomorfia de Pedipalpi apenas, é aplicável aos palpos dos escorpiões e pseudoescorpiões. Apoteles

estão ausentes também nos palpos dos Actinothrichida, e foram perdidas convergentemente em alguns opiliões, como nos gêneros *Nemastoma* e *Sabacon*, aqui inclusos (Alberti, 2006, Giribet *et al.*, 2002).

45. *Órgão adesivo palpal* (0 = ausente; 1 = presente).

Os Solifugae apresentam uma estrutura adesiva na extremidade do palpo (Punzo 1998). Apesar de que os solífugos não possuírem uma apotele *sensu stricto*, e o órgão palpal articular-se através de côneilos laterais, ele pode representar uma apotele extremamente modificada (Dunlop 2002).

Ovígeros e pernas locomotoras

46. *Ovígeros* (0 = ausente; 1 = presente).

A modificação do terceiro apêndice para portar os ovos é uma apomorfia dos Pycnogonida (Giribet *et al.* 2002, caráter 40; Dunlop & Arango, 2005). No entanto, da mesma forma que os quelíforos e os palpos, as pernas ovígeras estão ausentes em alguns grupos como, por exemplo, o gênero *Endeis*. Nesse caso, não houve uma reversão à condição de uma perna locomotora, mas a perda total do apêndice, tal qual em toda a família Phoxichilidiidae (Arango, 2002).

47. *Gnatobases* (0 = presente; 1 = ausente).

Dentre os quelicerados recentes, apenas Xiphosura retém gnatobases dentadas ao longo das coxas dos apêndices posteriores às quelíceras. Essa é uma característica amplamente aceita como relacionada à maneira primitiva de aquisição de alimentos por parte dos quelicerados. Dentre os grupos fósseis de artrópodes, é conhecido para vários grupos,

inclusive as trilobitas, eurypterídeos e vários aracnomorfos. É curioso notar que as sérrulas na coxa do palpo das aranhas (ou gnatocoxas) de certa forma reinventaram a função mastigadora das gnatobases.

48. *Perna I anteniforme* (0 = ausente; 1 = presente).

Tal caráter foi proposto por Shultz (1999, caráter 16) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi. Tanto Solifugae quanto Palpigradi de alguma forma também andam sobre apenas três pares de pernas e utilizam a perna I para explorar o ambiente a frente do animal. No entanto, eles não possuem o mesmo grau de modificação exibido pelas pernas em Pedipalpi nos quais as pernas anteniformes são marcadamente diferentes das aquelas usadas para locomoção, são codificados como estado “0”, portanto.

49. *Perna I, articulação esterno-coxa* (0 = ausente; 1 = presente).

O padrão específico de articulação foi proposto por Shultz (1999, caráter 25) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

50. *Apotele do primeiro par de pernas* (0 = presente; 1 = ausente).

A redução da apotele nas pernas anteniformes dos Pedipalpi foi sugerida por Shultz (1999, caráter 17) como uma sinapomorfia potencial do grupo. De fato, as garras da apotele parecem ser retidas em Amblypygi, apesar de que de forma extremamente reduzida (e.g. Weygoldt 2000, fig. 81). A apotele da perna I é substituída por uma escova de setas em alguns Solifugae (e.g., Roewer, 1934), que são codificados como 0/1 para esse caráter.

51. *Perna II* (0 = não modificada; 1 = alongada).

Em Ricinulei e na maioria dos Opiliones – mas não no grupo geralmente tido como basal, Cyphophthalmi – o segundo par de pernas locomotoras (ou quarto apêndice prosomal) é consideravelmente mais longo e é tipicamente usado para explorar o ambiente, à maneira de uma antena (Giribet *et al.* 2002, caráter 70).

52. *Exopodito no sexto apêndice prosomal (perna IV)* (0 = presente; 1 = ausente).

Do apêndices originalmente birremes, o exopodito é retido na forma do assim conhecido flabelo (ou basipódio, em algumas terminologias) articulado à cada uma das coxas do último par de pernas dos Xiphosura. Dunlop *et al.* (2004) descreveram condição muito similar em apêndices dissociados, supostamente pertencentes a *Chasmatspis*. Apesar que no sinzifurídeo *Weinbergina*, amplamente aceito como basal entre os “mesrostomata”, as pernas aparentemente são todas unirremes no prossoma (Stürmer & Begström, 1981). O enigmático *Offacolus*, como a maioria dos Arachnomorpha, retém pernas birremes em todos os apêndices prossomais (Orr *et al.*, 2000, Sutton *et al.*, 2002). Os exopoditos nessas pernas são perdidos em todos os Arachnida; (veja, por exemplo, Giribet *et al.*, 2002, caráter 110). Mas é importante lembrar aqui que vários Acariformes, Solifugae, Schizomida retém órgãos laterais que são prováveis modificações do exopodito da perna II, e que são aqui contemplados ao se discutir outros caracteres.

53. *Articulação coxotrocanteral* (0 = simples; 1 = complexa).

A articulação coxotrocanteral nas ordens Araneae, Amblypygi, Uropygi e Schizomida têm sido descrita como mais complexa que a dos demais aracnídeos pela presença dos escleritos intercalários; cf. Shultz (1989, 1990, caráter 24).

54. *Fêmur dividido em basi- e telo-fêmur nas pernas 3 e 4* (0 = presente; 1 = ausente)

Shultz (1989, 1990, caráter 25) discutiu interpretações anteriores desse artículo extra das pernas de vários aracnídeos, às vezes considerado como um “trocâter” ou um “fêmur” extra. Em todos os casos, Shultz (1989) os tratou como a retenção da divisão plesiomórfica do fêmur em basi- e telofemur; um caráter retido nos Pycnogonida vivos, Ricinulei, Solifugae e parte dos ácaros (Opilioacariformes, a maioria dos Actinotrichida). Em alguns esquemas (e.g., van der Hammen, 1989), Palpigradi também é interpretado como possuindo o fêmur bipartido. Essa suposição não foi seguida por Shultz (1989) devido a evidências do padrão de inserção da musculatura extrínseca, de forma que são codificados aqui como possuindo um fêmur inteiro.

55. *Articulação femuropatelar* (0 = pivotante transversal; 1 = bicondilar; 2 = monocondilar).

Interpretado por Shultz (2007a, caráter 69) como uma articulação pivotante na maioria dos aracnídeos, com a condição bicondilar presente nos opiliões, escorpiões e pseudoscorpiones. A condição monocondilar aparece aqui como uma autapomorfia de Solifugae.

56. *Articulação patelotibial* (0 = monocondilar; 1 = pivotante; 2 = bicondilar).

A condição monocondilar dessa articulação foi considerada por Shultz (1990, caráter 31) como plesiomórfica, modificada em pivotante nos dois grupos de ácaros, Ricinulei e Solifugae e em uma condição bicondilar com uma articulação ventral adicional nos opiliões, escorpiões e em parte dos pseudoscorpiones.

57. *Articulação patelo-tibial com uma articulação auxiliar posterior* (0 = ausente; 1 = presente).

Esse padrão específico de articulação foi proposto por Shultz (1999, caráter 18) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi. A forma como isso relaciona-se ao caráter anterior, não está clara. Tal articulação pode ser parte de um único caráter complexo; talvez homólogo ao estado 2 do caráter acima, mas preferiu-se mantê-lo tal qual proposto originalmente.

58. *Apêndices dos somitos pós- orais III–V com tibia e tarso fusionados* (0 = ausente; 1 = presente).

A fusão da tibia com o tarso é observada nos Xiphosura viventes, nos quais esse artículo composto forma o dígito fixo da quela das pernas acima referidas, e se articula em oposição ao dígito móvel, que é constituído pela apotele. Esse arranjo é aparentemente ausente no Synziphosurina *Weinbergina* (Moore et al., 2005), que retém a tibia e o tarso como elementos separados.

59. *Tarsos* (0 = tarso dividido em basi- e telo- ou disti- tarso; 1 = tarso indiviso).

O ‘basitarso’ *sensu* Shultz é equivalente ao metatarso, na terminologia aracnológica mais convencional. O estado 1 ocorre no Xiphosura modernos (Shultz, 1989) e nos ácaros Acariformes (Lindquist, 1984; Evans, 1992), com a exceção de Erythraeinae dentre os Anystidae o que é uma provável convergência. Nos pseudoscorpídeos, o estado 1 ocorre no par de pernas anterior dos Chthonioidea, que são codificados como 0/1 aqui, e em todas as pernas de Feaelloidea (Chamberlin, 1931). Um anel circumtarsal é observado nos ácaros Anactinotrichida, e pode representar a junção entre o basi- e o

telotarso (Evans, 1992); daí esse caráter ser aqui codificado como ambíguo para esse táxon.

60. *Telotarsos das pernas locomotoras 2–4 com três tarsômeros* (0 = ausente; 1 = presente).

Tal padrão de divisão do tarso foi proposto por Shultz (1999, caráter 18) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi, mas parece estar presente na ordem extinta Haptopoda; esta mais os Pedipalpi formam o grupo Schizotarsata (Shultz 2007a).

Alguns outros aracnídeos, especialmente vários opiliões com pernas longas, podem ter inúmeros tarsômeros nas extremidades das pernas, mas não o arranjo específico codificado aqui.

61. *Apotele* nos apêndices locomotores (0 = um cone simples ou lâmina; 1 = composto por uma peça medial, compreendendo uma garra ou pulvilo, comumente portando um par de garras laterais).

A maioria dos Arachnomorpha apresenta uma peça terminal tridáctila na extremidade de suas pernas. As principais exceções compreendem Eurypterida, *Chasmastaspis*, alguns escorpiões fósseis e os Xiphosura viventes (Dunlop, 2000; Hou & Bergström, 1997).

62. *Pulvilo* (0 = ausente; 1 = presente).

Uma estrutura flexível em sua função (geralmente adesiva) existente entre as garras terminais das pernas tem sido denominada de pulvilo ou empódio na literatura. Essas estruturas podem ser encontradas nos Pseudoscorpiones, Solifugae, parte dos Amblypygi e ácaros Parasitiformes. Quando uma estrutura similar ocorre entre os ácaros

Acariformes incluídos na presente análise, como em *Sancassania* e *Rhizoglyphus*, ela é invariavelmente acompanhada por uma garra medial.

63. *Quelas presentes nas pernas locomotoras* (0 = ausente; 1 = presente).

As pernas locomotoras (i.e. apêndices III–VI) nos Xiphosura viventes, *Offacolus*, e (até onde conhecidas) em *Chasmastaspis* terminam em uma apotele terminal que se move contra o tarso ou tibiotarso. Esse caráter poder ser enunciado de maneira ainda mais específica se se levar em conta que as pernas anteriores dos Xiphosura viventes do sudeste asiático são na verdade subqueladas.

64. *Garras subdivididas* (0 = ausente; 1 = presente).

Garras subdivididas nas pernas locomotoras em que a extremidade se articula com o restante da garra são conhecidas apenas para os solífugos (Roewer 1934; Punzo 1998; Dunlop 2002).

Opistossoma e seus apêndices

Dados incompletos a respeito da embriologia de algumas ordens de aracnídeos tornam a estrutura do opistossoma e de seus possíveis apêndices um dos aspectos menos conhecidos da morfologia dos quelícerados. Quase todas as estruturas associadas com os segmentos opistossomais já foram em algum momento advogadas como derivadas de precursores embrionários apendiculares. Apenas a quilária dos Xiphosura, os pentes dos escorpiões, as fiandeiras das aranhas, os pulmões e brânquias foliares e alguns espiráculos traqueais nas aranhas podem ser associados com uma origem apendicular com certeza (e.g. Damen *et al.*, 2002). A estratégia aqui adotada para codificar essas estruturas assume que sejam homólogas às pernas posteriores dos artrópodes

Arachnomorpha, provavelmente correspondendo principalmente aos exopoditos (mas veja caracteres individuais como os pulmões e opérculos pulmonares para detalhes). Considerações a respeito dos possíveis derivados apendiculares do opistossoma também podem ser encontradas na discussão dos resultados das análises.

65. *Apêndices opistossomais achatados, em forma de placa* (0 = ausente; 1 = presente).

Weygoldt & Paulus (1979) consideraram esse um caráter definidor para Euchelicerata, sendo que esses apêndices modificados estão ausentes nos Pycnogonida, mesmo nas formas fósseis que conservam um opistossoma polissegmentado, como *Palaeoisopus*. Eles ocorrem como largas estruturas portando as brânquias em Xiphosura, e foram demonstradas (Shultz 1993, 1999) nos segmentos portadores de pulmões dos aracnídeos tetrapulmonados. Assim, os “esternitos” dos segmentos II e III do opistossoma desses animais na verdade são parte de um apêndice altamente modificado, que porta pulmões foliares. Eles certamente ocorrem nos fósseis mais antigos de escorpiões, e contribuem para os esternitos dos escorpiões modernos (Jeram, 2001). Mas o caráter é de difícil interpretação para a maioria dos aracnídeos que não possuem pulmões ou brânquias, sendo que não é claro se os “esternitos” do opistossoma desses animais são esternitos verdadeiros ou se receberam alguma contribuição de precursores apendiculares. Para essas ordens, o estado é codificado como ambíguo.

66. *Número de segmentos corpóreos* (0 = vinte; 1 = dezenove; 2 = dezoito; 3 = dezessete; 4 = dezesseis; 5 = quinze; 6 = catorze; 7 = treze; 8 = doze; 9 = nove).

Shultz (2007a, caráter 95) codificou o número de segmentos opistossomais. Essa abordagem é válida para os quelícerados, uma vez que eles apresentam invariavelmente a abertura genital no segundo segmento opistossomal, o que serve de referência segura

para a contabilidade dos segmentos opistossomais. Ao se incluir os Pycnogonida nesta análise, perdeu-se essa referência, já que neles as gônadas se abrem na base dos apêndices. Além disso, há intenso debate sobre incluir ou não o último par de pernas desse grupo no prossoma ou opistossoma, e como proceder com as espécies que apresentam apêndices extranumerários. Seguiu-se aqui a abordagem de Wills *et al.* (1998, caráter 41) de simplesmente codificar o número total de segmentos. No caso dos Euchelicerata, isso significa acrescentar sete segmentos (o primeiro protocerebral e destituído de apêndices e seis segmentos que apresentam apêndices) ao número codificado por Shultz. Os ácaros Acariformes frequentemente apresentam algum grau de anamorfose, isso é, a adição de segmentos durante o desenvolvimento pós-embriônico. Levou-se em conta aqui o polimorfismo do grupo, conforme expresso pela revisão feita por Kethley (1990) a respeito desse aspecto.

67. *Junção do prossoma e opistossoma* (0 = larga, latigastra; 1 = cefalotórax como expresso nos Xiphosura; 2 = contato externo entre o sexto e oitavo segmentos; 3 = estreita, caulogastra).

Os Xiphosura viventes parecem ter avançado na tendência de incorporar segmentos à região cefálica adiante. Seu ‘cefalotórax’ *sensu* Scholl (1977) e Shultz (2001) incorpora elementos dorsais dos segmentos opistossomais I e II, uma condição potencialmente derivada, que dá a eles um escudo cefálico mais longo que o de qualquer carapaça de aracnídeo. Esse caráter é difícil de acessar nos Xiphosura fósseis, nos quais faltam a musculatura e dados da embriologia. Mas note-se que o microtergito que apresentam fósseis como *Legrandella* e *Bellinurus* provavelmente consistem no tergito do primeiro segmento opistossomal (Anderson & Selden 1997). É importante salientar que esse uso

específico do termo cefalotórax é distinto o uso mais geral no jargão aracnológico que é sinônimo de prosoma.

Apesar de alguns autores reconhecerem apenas a simplista divisão em ‘Latigastrea’, com uma ampla junção prossoma-opistossoma e ‘Caulogastrea’ com uma junção estreita, esse caráter prova-se muito mais complexo. Nos escorpiões, a “junção ampla” não se dá entre os segmentos sexto e sétimo, mas entre os segmentos sexto e oitavo, pois o segmento sétimo está reduzido aos componentes do diafragma. Condição bastante similar é encontrada nos Eurypterida (Dunlop & Webster, 1999). Ela é expressa pelos escorpiões é codificada em um estado de caráter distinto aqui.

A junção entre as duas regiões do corpo é estreita em Solifugae, Palpigradi, Ricinulei, Amblypygi e Araneae. Alguns autores (c.f. Weygoldt & Paulus 1979) preferem nomear isso como pedicelo e considerá-lo presente apenas nas aranhas e Amblypygi; outros preferem considerar diferentes tipos de pedicelo (Shultz, 2007a, caráter 97). Nós reconhecemos essas dificuldades de definição e preferimos fazer notar simplesmente um estreitamento na transição do prossoma para o opistossoma provavelmente relacionado à constrição do primeiro segmento opistossomal, que pode afetar outros segmentos (e.g. Ricinulei).

68. *Mecanismo de tranca entre opistossoma e prossoma* (0 = ausente; 1 = presente).

Um “mecanismo de tranca”, em que o tergito opistossomal anterior é modificado para encaixar-se em uma dobra correspondente na parte posterior da carapaça, é observado em Ricinulei e na ordem fóssil Trigonotarbida (Dunlop, 1996).

69. *Tergitos opistossomais trilobados* (0 = ausente; 1 = presente).

Os Ricinulei recentes e os Trigonotarbida apresentam os tergitos opistossomais subdivididos longitudinalmente (Dunlop, 1996).

70. Diplossegmentos (0 = ausente; 1 = presente)

Selden (1992) notou que os três largos tergitos posteriores ao mecanismo de trancamento no Ricinulei fóssil *Terpsicroton alticeps* são fusionados aos pares, uma vez que eles preservam dois pares de apódemas. Além disso, é considerado um diplotergito o primeiro tergito do opistossoma, associado com o mecanismo de trancamento presente nessa ordem e em Trigonotarbida (Dunlop, 1996).

71. Fusão dos tergitos dos segmentos opistossomais (0 = ausente; 1 = presente).

Nos Xiphosura viventes e espécies fósseis próximas, mas não no conjunto heterogêneo de espécies fósseis conhecidas como Synziphosurina (Anderson & Selden 1997), os tergitos opistossomais são fusionados em uma única e rígida placa (Shultz, 2001).

72. Apêndices do segmento opistossomal I (0 = presente; 1 = ausente).

Os Xiphosura modernos retiveram esse apêndice como a quilária e em alguns Synziphosurina, como *Weinbergina*, ele foi retido como uma perna locomotora completamente desenvolvida. Ao menos nos esquemas mais recentes a respeito do seu plano corpóreo (Vilpoux & Walossek, 2003), uma perna no primeiro segmento “opistossomal” está presente nos Pycnogonida, sendo que seus quatro pares de pernas usadas na locomoção não correspondem às dos aracnídeos. Shultz (2001, caráter 4) propôs a perda dos apêndices do primeiro segmento opistossomal como uma possível sinapomorfia dos aracnídeos, fazendo referência explícita aos adultos (veja o próximo caráter a respeito da ocorrência desses apêndices em embriões).

73. *Apêndices embrionários no primeiro segmento do opistossoma* (0= presente; 1= ausente)

Escorpiões e solífuges retêm precursores de apêndices no primeiro segmento opistossomal durante o desenvolvimento embrionário (Farley 2005: fig. 1, Yoshikura, 1975). Nos escorpiões há indícios de que o esterno seja derivado (ao menos em parte) dos elementos apendiculares desse segmento (Farley 2005: 2). Já os solífuges são notáveis por reterem o conjunto mais completo de precursores apendiculares no opistossoma (Yoshikura, 1975).

74. *Opérculo genital estendendo-se sobre o esternito do terceiro segmento opistossomal* (0 = ausente; 1 = presente).

A assim chamada condição ‘mega-operculata’ é presente claramente em Amblypygi, Telyphonida e Schizomida, nos quais o opérculo genital é amplo e recobre o verdadeiro esternito do segmento seguinte. O mesmo é codificado por Shultz (1990, caráter 42) como presente nas aranhas também. Essa visão é pouco compatível com o fato de apenas Mesothelae reter o esclerito genital (nos outros clados de aranha ele é reduzido a um par de opérculos dos pulmões foliares) e, mesmo em Mesothelae, evidências para o recobrimento do terceiro esternito é aqui tido como um equívoco. Mesmo assim, manteve-se a codificação do mega-opérculo como presente em aranhas. Palpigradi claramente é destituído de um “mega-opérculo”, uma vez que o lobo anterior que acompanha a abertura genital não obscurece o esternito do segmento seguinte, em discordância com Shultz (2007a).

75. *Glândulas de seda e fúsculas* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas estruturas glandulares complexas, produtoras de seda e que se abrem através de fúsculas são uma sinapomorfia de Araneae e a ordem recentemente estabelecida Uraraneida (Selden *et al.*, 2008).

76. *Fiandeiras opistossomais* (0 = ausente; 1 = presente.)

As fiandeiras das aranhas são estruturas derivadas de apêndices opistossomais e representam uma inequívoca apomorfia da ordem. Especificamente, elas não são encontradas em Uraraneida, no qual as fúsculas aparecem distribuídas no ventre de alguns segmentos do opistossoma (Selden *et al.* 2008).

77. *Secreções pigidiais defensivas* (0 = ausente; 1 = presente).

Telyphonida deve seu nome popular de escorpião-vinagre à secreção defensiva a base de ácido acético. O produto resulta da atividade das glândulas pigidiais localizadas na parte posterior do opistossoma. Codificou-se esse caráter como presente para Schizomida também (como em Shultz 1990, caráter 46), muito embora a presença de tais glândulas tenha sido confirmada apenas para umas poucas espécies dessa ordem (Redell & Cokendolpher, 1995).

78. *Acetábulo genitais* (0 = ausente; 1 = presente)

Essas estruturas são um traço característico dos ácaros Acariformes que as possuem usualmente em três pares (mas veja o caráter seguinte), provavelmente associadas aos segmentos opistossomais 3 a 5. São provavelmente serialmente homólogos aos órgãos de Claparède ou ‘Urstigmata’, compartilhando a mesma ultraestrutura e função (Alberti, 1977; Bartsch, 1973). Isso sugere que sejam derivados dos exopoditos dos apêndices opistossomais, já que as observações embriológicas mostram que os órgãos de

Claparède são originários da modificação do exopodito da perna II (Thomas & Telford, 1999).

79. *Número de acetábulos genitais* (0 = três; 1 = dois; 2 = mais que três)

Dentre os Acariformes, o número de acetábulos genitais pode variar em relação à sua função no balanço iônico desses animais. Espécies de água doce possuem um número muito aumentado de acetábulos genitais, que bombeiam ativamente íons para a hemolinfa. Caráter aplicável apenas para espécies de Acariformes que possuam acetábulos genitais.

Estruturas sensoriais e sistema nervoso

80. *Olhos* (0 = presente; 1 = ausente)

Algumas espécies sob consideração aqui são completamente cegas, como a maioria dos Oribatida e Palpigradi.

81. *Olhos laterais* (0 = ausente; 1 = presente)

Olhos laterais estão ausentes em opiliões e Pycnogonida, exceto por Cyphophthalmi, grupo em que é incerto se os olhos, posicionados lateralmente, foram secundariamente deslocados para a sua posição atual ou são olhos laterais verdadeiros (Alberti *et al.*, 2008). Grupos completamente cegos são codificados como inaplicáveis para esse caráter, uma vez que a perda independente dos olhos laterais e médios não é passível de ser determinada pelos dados disponíveis.

82. *Lentes dos olhos laterais* (0 = compostos; 1 = cinco ou mais pares de lentes; 2 = três pares de lentes (microlentes desconsideradas); 3 = dois pares; 4 = um par; - = inaplicável, devido à ausência de olhos laterais.)

Os olhos da maioria dos Arachnomorpha são compostos, como são os olhos dos Xiphosura viventes, único grupo recente a apresentar tal condição. Esse é aparentemente o caso de alguns escorpiões do paleozóico, Eurypterida e Chasmataspidida, embora as facetas individuais não possam sempre ser determinadas nos fósseis. O caráter é codificado de acordo com Shultz (2007a, caráter 140) para os aracnídeos. Os Ricinulei viventes possuem manchas fotossensíveis sem lentes; por isso eles são codificados com um número indeterminado de olhos laterais. Muitos Ricinulei fósseis apresentam dois pares de lentes, no entanto. O mesmo ocorre com os ácaros Rhagidiidae, dentre os Actinotrichida.

83. *Rabdômeros dos olhos laterais* (0 = dispostos em rede; 1 = dispostos em forma de estrela).

Os rabdômeros dos Xiphosura e Scorpiones compartilham essa disposição em estrela, enquanto os demais aracnídeos os possuem arranjados em rede. O arranjo em estrela foi considerado plesiomórfico por Weygoldt & Paulus (1979, caráter 21). O caráter é inaplicável a grupos que não possuem olhos laterais.

84. *Olhos mediais* (0 = quatro; 1 = dois; 2 = ausente).

Os Pycnogonida possuem um tubérculo ocular com quatro olhos e isso já foi considerado (Weygoldt & Paulus 1979) como plesiomórfico. Todos os Euchelicerata possuem dois olhos mediais ou nenhum, como em Ricinulei, Pseudoscorpiones e Schizomida (Weygoldt e Paulus, 1979, caráter 14; Giribet *et al.*, 2002, caráter 1). Eles

podem estar presentes ou ausentes nos Acariformes, mas são ausentes em todos os Anactinotrichida.

85. *Células retinulares dos olhos mediais* (0 = organizadas em rabdons fechados; 1 = organizados em uma rede de rabdômeros; 2 = desorganizadas; 3, retina invertida).

A codificação segue Shultz (2007a, caráter 137).

86. *Lirifissuras* (0 = ausente; 1 = presente).

Esses órgãos em fenda funcionam na percepção das tensões sobre o exoesqueleto. O termo foi cunhado para fazer referência aos órgãos liriformes (nos quais se encontram agrupadas) de alguns aracnídeos, mas acabou incorporando-se ao jargão acarológico como uma referência a fendas individuais. Todos os aracnídeos as possuem, exceto Palpigradi; e.g. Shultz (1990, caráter 47, 2000, caráter 2) e são assim consideradas potenciais apomorfias dos aracnídeos, com uma possível reversão nos Palpigradi.

87. *Tricobótrios* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas finas setas sensoriais inserem-se em soquetes especializados, o botrídio, e detectam vibrações no ar, sendo fundamentais para que alguns aracnídeos detectem suas presas ou outras fontes de movimento em sua vizinhança. Eles não são vistos em Pycnogonida e Xiphosura, mas aparentemente ocorrem em todas as ordens de aracnídeos, com exceção de Solifugae, Ricinulei e Opiliones (Selden *et al.*, 1991).

88. *Tricobótrios nas tíbias com distribuição 2-1-1-1* (0 = ausente; 1 = presente).

Esse padrão específico de distribuição dos tricobótrios nas tíbias foi proposto por Shultz (1990, caráter 48) como uma sinapomorfia unindo Telyphonida e Schizomida. É inaplicável para táxons em que os tricobótrios estão ausentes (veja o caráter anterior).

89. *Tricobótrio inserido no prodorso* (0 = ausente; 1 = presente)

A presença de tricobótrias no prodorso é uma característica frequentemente evocada para distinguir Actinotrichida de Anactinotrichida. Mas, da mesma forma que vários outros caracteres ácaro-específico, é difícil acessá-lo com certeza para todos os, geralmente muito maiores, táxons de aracnídeos.

90. *Pentes* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas estruturas únicas dos escorpiões parecem ser derivadas de apêndices opistossomais, e agem primariamente como órgãos quimiorreceptores. Apesar de ocorrerem imediatamente atrás da abertura genital, alguns autores como Weygoldt & Paulus (1979) consideraram-nos como pertencentes ao segundo (ou genital) segmento e partes de um plano corpóreo para os escorpiões que incluía apenas doze segmentos no opistossoma. Dados oriundos da expressão de genes homeóticos obtidos por Simonett *et al.* (2006) e corroborados por dados morfológicos apresentados por Shultz (2007b) indicam que os pentes são de fato derivados do terceiro segmento opistossomal e parte de um opistossoma composto por treze segmentos, em que pese o primeiro segmento opistossomal resultar reduzido ao final do desenvolvimento. Finalmente, é digno de nota que o escorpião fóssil *Proscorpio osborni* parece não possuir pentes, pondo em dúvida a universalidade do caráter dentre os membros basais da ordem (Dunlop *et al.* 2008).

91. *Maleoli* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas estruturas sensoriais únicas são uma sinaapomorfia da ordem Solifugae; ocorrem nos artigos basais das pernas IV (Punzo 1998).

92. *Órgãos tarsais na perna I* (0 = ausente; 1 = presente).

Os órgãos tarsais ou órgãos de Haller ocorrem na perna I dos Opilioacariformes, Holothirya e Ixodida (Klompen, 2000), nas pernas I e II de Ricinulei (Talarico *et al.*, 2005) e em todas as pernas das aranhas e talvez, escorpiões (Foelix, 1985). A codificação desse caráter, e o seguinte acompanham Shultz (2007a, caracteres 149, 150).

93. *Órgãos tarsais nas pernas II* (0 = ausente; 1 = presente).

Presentes em Araneae e Ricinulei.

94. *Gânglios opistossomais nos adultos* (0 = ausente; 1 = presente).

Em alguns aracnídeos, como na maioria das aranhas, existe uma tendência para a consolidação dos gânglios do sistema nervoso central no prossoma, efetivamente formando um cérebro ou massa nervosa única. Alternativamente, alguns grupos possuem gânglios também no opistossoma.

95. *Membrana perineural envolvendo o sinus arterial* (0 = presente; 1 = ausente).

Firstman (1973) notou a presença dessa membrana em todas as espécies com pulmões foliares, mas é ausente nos Xiphosura, que possuem brânquias foliares.

96. *Órgão medial interqueliceral* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa estrutura pequena e móvel emerge entre as quelíceras dos Palpigradi. Se ela representa uma seta modificada ou um elemento vestigial homólogo a algum apêndice

pré-queliceral não é claro. Van der Hammen (1982) especulou se ela não poderia ser homóloga ao naso dos Acariformes.

Sistema respiratório

97. *Órgãos respiratórios* (0 = pulmões ou brânquias foliares; 1 = traquéias; 2 = ausente).

Com relação a esse caráter, não se faz, aqui, distinção entre pulmões e brânquias foliares. Apesar de tradicionalmente codificados como ausência e presença de pulmões, a estratégia adotada reconhece que o ancestral comum (ao menos dos grupos com estruturas respiratórias lamelares) possuía uma série de brânquias iniciada no segmento genital. As diferenças entre os dois, como sublinhadas por Scholtz & Kamenz (2006), são reconhecidas separadamente abaixo. As brânquias foram retidas apenas em Xiphosura. Nos escorpiões elas transformaram-se em pulmões. Note que muitas aranhas também apresentam traquéias (daí a codificação ambígua para esse caráter). Vários quelicerados respiram através de traquéias apenas. Outros não possuem estruturas respiratórias (Palpigradi, Pycnogonida, alguns ácaros). Uma divisão simples entre pulmonados e apulmonados foi criticada no passado e é aqui codificada com reservas, uma vez que, nos grupos em que ocorrem, pulmões e traquéias não se abrem nos mesmos segmentos. Algumas dessas dificuldades refletem-se nos caracteres que seguem.

98. *Órgãos respiratórios foliares no segundo segmento opistossomal (segmento genital)* (0 = presente; 1 = ausente).

É digno de nota que alguns quelicerados fósseis, como *Weinbergina* e provavelmente o enigmático *Offacolus kingi*, apresentam uma série de possíveis brânquias foliares,

iniciando-se no segmento genital (Sutton *et al.*, 2002). Tal conjunto completo de estruturas respiratórias está ausente nos quelícerados vivos. Dentre os aracnídeos, a presença de tais órgãos no segmento genital é exclusiva dos Tetrapulmonata e da ordem fóssil Trigonotarbid.

99. *Órgãos respiratórios foliares no terceiro segmento opistossomal* (0 = presente; 1 = ausente).

Os Xiphosura e os Tetrapulmonata possuem órgãos respiratórios nesse segmento. Eles estão ausentes nos escorpiões, nos quais parecem ter sido substituídos pelos pentes, e talvez nos Eurypterida (Braddy *et al.*, 1999). Notar que em muitas aranhas (Araneae: Araneoclada), o terceiro segmento do opistossoma possui traquéias ao invés de pulmões.

100. *Órgãos respiratórios foliares nos segmentos opistossomais 4-7* (0 = presente; 1 = ausente).

Brânquias foliares estão presentes nesses segmentos nos Xiphosura vivos e escorpiões. Estão ausentes em Tetrapulmonata e na ordem extinta Trigonotarbid.

Notar que os caracteres 101–103 estão relacionados à transformação das brânquias em pulmões. Assim também são codificados apenas para grupos que possuem órgãos respiratórios foliares.

101. *Espiráculos* (0 = ausente; 1 = presente)

Aqui considerou-se os espiráculos de todos os pulmões foliares, que foram tomados por homólogos entre si, uma hipótese bastante controversa, já que diferem

consideravelmente na sua orientação. Parte dos escorpiões fósseis não apresenta os espiráculos ventrais característicos dos membros modernos da ordem.

102. *Espinhos na margem das lamelas pulmonares* (0 = ausente; 1 = presente)

Todos os pulmões foliares possuem espinhos nas margens de suas lamelas respiratórias dirigidos para a câmara atrial. Possivelmente ajudam a prevenir a entrada de partículas que poderiam causar danos a essas delicadas estruturas (Scholtz & Kamemz, 2006).

Esses espinhos faltam nas brânquias dos Xiphosura. Foram, no entanto, encontrados nos extremamente bem preservados pulmões foliares de *Palaeocharinus* (Trigonotarvida).

103. *Formato dos pilares nas lacunas preenchidas por hemolinfa dentro das lamelas respiratórias* (0 = ao menos dois *pericaria* encontrando-se a meio caminho no interior da lacuna; 1 = pilares, incluindo um forte eixo composto por microtubulos).

O estado 1 é encontrado nas brânquias de Xiphosura (Scholtz & Kamenz, 2006).

104. *Espiráculos prossomais* (0 = ausente; 1 = entre as coxas das pernas II e III; 2 = associadas às coxas das pernas III e IV; 3 = entre as bases das quelíceras; 4 = Sistema traqueal “Brachypylin”).

Aberturas das traquéias entre as coxas II e III (e.g. Giribet *et al.* 2002, caráter 25) são uma apomorfia potencial da ordem Solifugae. Aberturas entre as coxas II e IV são observadas nos Ricinulei e codificadas, aqui, para os Anactinotrichida, com exceção de *Opilioacarus* (veja o caráter seguinte). Espiráculos entre as quelíceras são encontradas em muitos Prostigmata, donde o nome do grupo, apesar de alguns membros desse táxon não possuírem órgãos respiratórios (Evans 1992, Alberti & Coons, 1999). A maioria dos Astigmata e Endeostigmata, dentre os Acariiformes, também não possuem órgãos

respiratórios. Os oribatídeos *Brachypylini* possuem espiráculos junto às inserções das pernas. Entre os Oribatida, ocorrem muitas outras estruturas respiratórias, mas não parecem informativas para as relações filogenéticas para grupos mais inclusivos (Alberti & Coons, 1999). Esses caracteres tocam na questão do que deve ser comparado, se a presença ou ausência de espiráculos ou sua correspondência com estruturas com que compartilham a origem embrionária, por exemplo.

105. *Espiráculos opistossomais* (0 = ausente; 1 = estigmas pareados no segmento genital; 2 = estigmas pareados nos terceiro e quarto segmentos opistossomais; 3 = quatro pares de estigmas dorsais na porção anterior do opistossoma).

O estado 1 desse caráter é codificado para os opiliões. O estado 2 refere-se à condição observada nos pseudoscorpídeos e solífuges, apesar dos últimos também possuírem um espiráculo não pareado no quinto segmento opistossomal. O estado 3 é autapomórfico para os Opilioacariformes.

Sistema digestivo

106. *Estômago muscular pós- cerebral* (0 = reduzido, 1 = presente).

Um estômago muscular bem desenvolvido está presente nos Xiphosura e é associado à ausência de qualquer traço de digestão extra-intestinal. Forma um caráter complexo sugerido como plesiomórfico em relação à ausência dessa estrutura nos aracnídeos (Shultz, 2001, caráter 8).

107. *Estômago com grande capacidade de sugar líquidos* (0 = ausente; 1 = presente).

Claramente presente em Araneae e Amblypygi, e tratado como sinapomorfia que dá suporte a Labellata, um clado que reuniria essas duas ordens, segundo Weygoldt & Paulus (1979, caráter 31). Shultz (1990, caráter 5) notou a sua presença vestigial nos Uropygi e alguns escorpiões. Shultz (2001) também notou que Xiphosura apresenta uma faringe pós-cerebral dotada de musculatura adaptada a sugar. A codificação segue Weygoldt & Paulus (1979), mas, baseado nos estudos feitos por Shultz, também foi considerado como presente nos Xiphosura.

Endosternito

108. *Endosternito* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa estrutura pode ser homóloga ao septo de Dohrn nos Pycnogonida, mas isso ocorre na forma específica de uma placa de tecido de origem mesodérmica não contrátil que recebe a inserção de vários músculos nos Euchelicerata (Shultz, 1990), com exceção dos solífuges. Firstman (1973) ofereceu uma descrição detalhada, na qual a ausência observada em Solifugae foi considerada um caráter derivado.

109. *Processos anteriores do endosterno* (0 = terminando em uma conexão muscular ao labro; 1 = terminado em uma conexão muscular à coxa do palpo).

O caráter 1 expressa a relação específica dos processos anteriores do endosternito com elementos do exoesqueleto encontrada nos Pedipalpi por Shultz (1999, caráter 4). É inaplicável, como o caráter seguinte, a animais sem um endosternito.

110. *Endosternito fenestrado* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa forma específica do endosternito é restrita aos Thelyphonida e Schizomida (Uropygi) (Schultz 1990, caráter 8).

Órgãos excretores

111. *Túbulos de Malpighi* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas estruturas excretoras são outro caráter tipicamente evocado como uma sinapomorfia de Arachnida. Os aracnídeos recentes, exceto Palpigradi, Opiliones e Pseudoscorpiones e quase todos os Acariformes; e.g. Shultz (1990, caráter 62). Dentre os últimos, estruturas similares aos túbulos de Malpighi foram encontradas nos Acaridae. Assim foram codificados como presentes em *Sancassania* e *Rhizoglyphus*, dentre as espécies aqui estudadas.

112. *Glândulas coxais abrindo-se no artículo proximal do quelíforo* (0 = ausente; 1 = presente).

Glândulas coxais são nefrídios modificados e como tal possuem origem mesodérmica. A abertura da glândula coxal, por sua vez, é oriunda de uma invaginação do ectoderme e pode não guardar correspondência com o segmento de origem do sáculo da glândula. Optou-se por simplificar a codificação para a posição das glândulas coxais nos Euchelicerata, reconhecendo a existência de duas possibilidades: a de uma abertura anterior e de outra, posterior, como sugerido por Weygoldt (2000). Isso reflete o incipiente entendimento da embriologia e organogênese de várias ordens. Fahrenbach & Arango (2007) descreveram a presença de um par de glândulas coxais associadas ao artículo proximal dos quelíforos de *Nymphopsis spinosissima* – a primeira ocorrência de órgãos excretores de qualquer tipo nos Pycnogonida. King (1973) sugeriu, baseado nos

resultados de técnicas de coloração, que órgãos excretores podem estar presentes na base de outras pernas, mas esses resultados carecem de confirmação. Com esse caráter, registramos a presença desses órgãos nesta posição específica, mas os seguintes dois caracteres serão codificados como desconhecidos para Pycnogonida.

113. *Glândulas coxais abrindo-se na base da perna I* (0 = ausente; 1 = presente).

O estado 1 é codificado aqui para todos os Euchelicerata viventes, exceto Xiphosura, Scorpiones, Opiliones e Pseudoscorpiones. Glândulas coxais abrem-se para o exterior nesta posição ou em posição, ainda mais anterior, graças à presença de dutos revestidos de cutícula, nas demais ordens (e.g. Shultz 1990, caráter 64, Shultz 2007a, caráter 180). A abertura das glândulas associadas aos palpos foi tida como uma autapomorfia de Solifugae (e.g. Shultz 1990), mas a condição em Solifugae é muito similar àquela observada em muitos Actinotrichida, em que um canal revestido de cutícula leva os fluidos das glândulas coxais até a câmara pré-oral.

114. *Glândulas coxais abrindo-se na base da perna III* (0 = ausente; 1 = presente).

Apresentam glândulas coxais abrindo-se junto à perna III os Xiphosura, as aranhas Mygalomorpha, Amblypygi basais (*Charinus*, nesta análise), Opiliones, Scorpiones e Pseudoscorpiones (e.g., Shultz 1990, caráter 63). Selden (1981) encontrou uma pequena cavidade junto à perna III em *Baltoeurypterus* (agora, *Eurypterus*) *tetragonophthalmus* que lembra a abertura de uma glândula coxal, opinião aceita por Shultz (2007a).

115. *Contribuição da glândula coxal à saliva* (0 = ausente; 1 = porção secretora associada à glândula coxal; 2 = fluidos produzidos pela glândula coxal convergem para a câmara pré-oral através de um canal superficial; 3 = canal podocefálico).

As glândulas salivares dos Onychophora são glândulas coxais modificadas, cujo saco terminal, que apresenta podócitos, é encontrado associado a uma região secretora hipertrofiada (Storch *et al.*, 1979, Buxton, 1913). Essa estrutura é bastante similar às glândulas coxais dos Palpigradi e Solifugae. Nos Solifugae, a participação da glândula coxal na produção de saliva é congruente com a presença de um canal de origem ectodérmica que se estende até a câmara pré-oral (Buxton, 1913, 1917; Alberti, 1979). Nos Palpigradi, tal relação é menos clara, já que os mecanismos que levam o fluido produzido pela glândula coxal não são conhecidos. Reconhece-se na codificação proposta aqui a similaridade, quanto à morfologia interna, com os Solifugae (*contra* Shultz, 2007a). A condição apresentada por Actinotrichida aproxima-se daquela dos Solifugae, funcionalmente. Canal podocefálico, que leva o produto de excreção das glândulas coxais até a câmara pré-oral, recebe também os produtos de secreção das demais glândulas salivares (Alberti & Coons, 1999). No entanto, cada glândula tem sua porção distal terminando em pequenos dutos revestidos de cutícula que convergem para o canal podocefálico. Assim, a conexão entre as glândulas é feita por canais de origem ectodérmica revestida por cutícula (e.g. Shatrov 2005). Apesar da semelhança funcional, a condição apresentada pelos Actinotrichida aparentemente evoluiu a partir de estruturas diferentes e não é codificada aqui como homóloga à condição dos Solifugae.

Tetrapulmonata, Ricinulei, Holothyrida, e Opiliocariformes apresentam canais superficiais que levam os fluidos das glândulas coxais para a câmara pré-oral, onde contribuem para a formação da saliva (Shultz, 2007a caráter 14). Scorpiones, Opiliones, Pseudoscorpiones, Xiphosura, Pycnogonida e Ixodida aparentemente não aproveitam o fluido produzido pelas glândulas coxais.

116. *Órgão dorso-medial* (0, ausente; 1, presente).

Essa região especializada da parte posterior do intestino médio ocorre apenas nos Prostigmata (Alberti & Coons 1999). Pode ou não estar relacionada à completa separação do intestino em uma porção anterior, digestiva, e uma posterior, excretora.

Musculatura

Musculatura faringeal

117. *Músculo lateral extrínseco da faringe pré-cerebral* (0 = emergindo dos processos anteriores do endosternito; 1 = emergindo da superfície medial da coxa do palpo;- inaplicável pela ausência de um endosternito).

Esse arranjo específico da musculatura da faringe foi proposta por Shultz (1999, caráter 6) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

118. *Músculos extrínseco ventral e tergo-faríngeo da porção pré-cerebral da faringe* (0 = presente; 1 = ausente).

Esse arranjo específico da musculatura da porção pré-cerebral da faringe foi proposto como dois caracteres distintos e sinapomórficos para Pedipalpi (Shultz, 1999, caracteres 7 e 8). Propõe-se aqui uni-los em um único caráter, para se evitar pesar a análise em direção a padrões individuais de inserção muscular.

Musculatura das quelíceras

119. *Músculo do segmento médio da quelícera ao tergum* (0 = ausente; 1 = presente).

Dentre os grupos cujas quelíceras possuem três artículos, esse músculo corre da carapaça para a margem do segundo artículo da quelícera. Só possui ocorrência

registrada nos escorpiões e opiliões (Shultz, 2000), para os quais foi proposto como uma possível sinapomorfia.

120. *Músculo tergoquelíceral lateral* (0 = uma única origem; 1 = três origens distintas).

Esse padrão específico de três origens (cabeças) do músculo tergoquelíceral lateral foi evocado por Shultz (1999, caráter 10) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

121. *Músculos pareados emergindo da margem posterior da dobra anterior da carapaça e inserindo-se na própria carapaça* (0 = ausente; 1 = presente).

Shultz (1999, caráter 1) descreveu esse par específico de músculos como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

Musculatura associada ao endosternito

122. *Músculos oblíquos do sistema treliçado da musculatura axial nos somitos pós-orais I–V* (0 = ausente; 1 = presente em um ou dois somitos).

Shultz (2001) investigou a musculatura axial dos Xiphosura em detalhes. O estado 0 ocorre nos Xiphosura, e o estado 1 ocorre em Palpigradi, Araneae, Amblypygi, Thelyphonida, Schizomida e Scorpiones (Shultz 2001, 2007a, caráter 127). A condição nos Acari, Ricinulei, Opiliones e Solifugae não é conhecida.

123. *Músculos oblíquos do sistema treliçado da musculatura axial no somito pós-oral VI* (0 = ausente; 1 = presente).

O estado 1 ocorre nos Xiphosura e pode representar a condição primitiva, quando comparada com outros artrópodes (Shultz, 2001; Shultz, 2007a, caráter 128). O estado 0 ocorre em todos os outros aracnídeos.

124. *Músculos extensores intercoxais-endosternais* (0 = ausente; 1 = presente).

A presença desse músculo específico é proposto como uma possível sinapomorfia de escorpiões e opiliões por Shultz (2000).

125. *Músculos suspensores endosternais dos somitos I e II* (0 = presente; 1 = ausente).

A ausência desses músculos suspensores foi sugerida por Shultz (2001, caráter 11) como uma possível sinapomorfia de Arachnida; apesar da possibilidade desses músculos estarem presentes, porém modificados, (veja Shultz , 2001: p. 301 para detalhes).

Inaplicável para os grupos que não apresentam endosternito.

126. *Músculos suspensores dorsais no segmento IV, com inserção anterolateral na carapaça.* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa inserção específica dos músculos suspensores endosternais é mais posteromedial nos Palpigradi, aranhas basais, Amblypygi e Uropygi, e frequentemente associada com a depressão (apódema) vista na porção média da carapaça desses aracnídeos (cf. Shultz 1990, caráter 7). Inaplicável para os grupos que não apresentam endosternito.

127. *Músculo suspensor dorsal endosternal do somito V* (0 = presente; 1 = ausente).

Esse padrão específico da musculatura endosternal foi proposto por Shultz (1999, caráter 9) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi. Inaplicável para os grupos que não apresentam endosternito.

128. *Músculos suspensores ventrais do endosternito* (0 = inseridos primariamente ao esterno; 1 = inseridos primariamente à coxa do apêndice imediatamente anterior ao somito).

Padrão particular da musculatura endosternal foi proposta por Shultz (1999, caráter 27) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi. Inaplicável para os grupos que não apresentam endosternito.

Musculatura do palpo

129. *Músculo posteromedial tergo-coxal* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa musculatura específica associada ao palpo foi proposta por Shultz (1999, caráter 12) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

130. *Músculo posteromedial endosterno-coxal do palpo* (0 = originário do endosternito, inserido na coxa; 1 = originado e inserido na coxa).

Tal musculatura endosternal foi proposta por Shultz (1999, caráter 13) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

Musculatura das pernas

131. *Músculo intracoxal* (0 = ausente; 1 = presente).

Shultz (1999, caráter 23) propôs esse caráter como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

132. *Processo onde se insere o músculo anteromedial tergo-coxal* (0 = fracamente desenvolvido; 1 = bem desenvolvido).

Também proposto por Shultz (1999, caráter 24) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

133. *Flexor femoro-patelar* (0 = simétrico; 1 = assimétrico).

O arranjo assimétrico desse complexo muscular foi proposto por Shultz (1990, caráter 27) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

134. *Músculo anterior femoro-patelar* (0 = inserindo-se primariamente na margem da patela; 1 = inserindo-se primariamente na plágula da patela).

Igualmente uma possível sinapomorfia de Pedipalpi (Shultz, 1999, caráter 19).

135. *Músculo posterior femoropatelar-tibial* (0 = presente; 1 = ausente).

A ausência desse músculo, em específico nas pernas locomotoras, foi considerado por Shultz (1999, caráter 20) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

136. *Músculo patelotibial-tarsal* (0 = presente; 1 = ausente).

Novamente, a ausência desse músculo nas pernas locomotoras foi proposta por Shultz (1999, caráter 21) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi.

137. *Inserção do músculo transpatelar posterior* (0 = porção dorsoposterior do fêmur/posterior da patela; 1 = processo distal do fêmur; 2 = ausente).

Shultz (1990, caráter 28) considerou uma origem femoral e/ou patelar desse músculo como a condição plesiomórfica e a sua origem do processo distidorsal do fêmur como uma apomorfia de Scorpiones, Opiliones e Pseudoscorpiones. Músculo ausente nos Solifugae, Ricinulei e Schizomida.

138. *Extensor patelotibial* (0 = ausente; 1 = presente).

De acordo com Shultz (1990, caráter 29), o músculo posterior transpatelar nos escorpiões e pseudoscorpiões possui um ponto de inserção dorsal específico que parece agir como um extensor patelotibial.

139. *Inserção anterior do músculo transpatelar* (0 = anterior/anteroventral; 1 = ventral/posteroventral; 2 = ausente).

Esse músculo é descrito (Shultz 1990, caráter 30) como normalmente inserido na margem anterior da tíbia, mas a inserção é ventral nos escorpiões, pseudoscorpiões e solífuges. Ausente em Ricinulei e Schizomida.

140. *Inserção do músculo patelo-tibial anterior na tíbia* (0 = anterior; 1 = ventral; 2 = ausente).

Shultz (1990, caráter 32) descreveu esse músculo como possuindo uma inserção ventral em Ricinulei, Scorpiones e Solifugae ; ausente em Pseudoscorpiones.

141. *Músculo patelotibial posterior* (0 = presente; 1 = ausente).

Músculo descrito por Shultz (1990, character 33) como apomorficamente ausente em Scorpiones, Pseudoscorpiones, Solifugae e Schizomida.

142. *Origem do depressor da apotele* (0 = tarso; 1 = tíbia).

A origem tibial do músculo depressor da apotele foi sugerida por Shultz (1990, caráter 35) como uma possível sinapomorfia para Arachnida.

143. *Ponto de origem patelar do depressor da apotele* (0 = ausente; 1 = presente).

O músculo depressor da apotele possui uma cabeça estendendo-se até a patela em Araneae, Uropygi, Schizomida, Opiliones, Scorpiones, Pseudoscorpiones e Solifugae (cf. Shultz 1989, 1990, caráter 36).

144. *Ponto de origem do músculo depressor da apotele na parede posterior da patela* (0 = ausente; 1 = presente).

A posição específica desse músculo da apotele foi sugerida por Shultz (1990, caráter 37) como uma possível sinapomorfia de Thelyphonida e Schizomida. Não é aplicável àqueles aracnídeos que não possuem o músculo depressor da apotele com uma ‘cabeça’ estendendo-se a patela (caráter anterior).

Musculatura opistossomal

145. *Inserções dos músculos axiais posteriores oblíquos* (0 = tergal; 1 = pleural).

Estado 0 foi sugerido como uma possível sinapomorfia de Arachnida por Shultz (2001, caráter 10). Dado o tronco altamente reduzido nas formas atuais, os caracteres relacionados à musculatura opistossomal são considerados inaplicáveis aos Pycnogonida.

146. *Músculo opistossomal pleural* (0 = faixa dorsoventral contínua; 1 = dividido em três componentes).

A divisão desse músculo foi proposta por Shultz (1999, caráter 28) como uma possível apomorfia de Pedipalpi.

147. *Músculos longitudinais dorsais e ventrais* (0 = estendendo-se continuamente por todo o comprimento do opistossoma; 1 = estendendo-se apenas pelo primeiro e, talvez, os quatro últimos segmentos).

Esse padrão específico de músculos longitudinais foi proposto por Shultz (1999, caráter 21) como uma possível sinapomorfia de Pedipalpi. O caráter é de difícil aplicação aos ácaros Actinotrichida, que têm opistossomas curtos. Estes foram tratados como de estado desconhecido (?) para esse caráter.

Reprodução

148. *Fertilização interna* (0 = ausente; 1 = presente).

Os machos dos Xiphosura lançam seu esperma sobre os ovos e dessa forma a fertilização é externa (e.g., Alberti, 2000) – presumivelmente um comportamento plesiomorfo – enquanto todos os aracnídeos usam diversos mecanismos de fertilização interna (delineados nos caracteres abaixo). A maneira precisa de como o esperma é transferido nos Pycnogonida não é conhecida (cf. Alberti 2000). Existe alguma evidência circunstancial de que a ordem fóssil Eurypterida possuía também fertilização interna, talvez através da deposição de espermatóforos.

149. *Localização dos gonoporos* (0 = nas bases das pernas; 1 = no segundo segmento opistossomal).

A abertura genital ocorre no segundo segmento opistossomal em todos os Euchelicerata vivos, enquanto Pycnogonida possui aberturas na base de cada perna. Se a posição observada nos Pycnogonida é plesiomórfica ou não é matéria de debate (Dunlop & Arango 2005). Argumentos em prol de ambas as hipóteses podem ser formulados, como

referir-se à migração de alguns sistemas de órgãos para as pernas e o virtual desaparecimento do opistossoma nesse último grupo.

150. *Número de gonoporos* (0 = pareados; 1 = não-pareados).

A consolidação dos dois gonoporos em um duto único tem sido sugerida como uma possível apomorfia de Arachnida, uma vez que Xiphosura possui gonoporos pareados no segundo segmento opistossomal (Shultz 2001, caráter 6).

151. *Abertura genital deslocada para uma posição mais anterior* (0 = ausente; 1 = presente).

Nos opiliões e ácaros Ixodida, a abertura genital está deslocada para uma posição anterior às coxas do quarto par de pernas (e.g., Giribet *et al.* (2002, caráter 165).

152. *Ovipositor* (0 = ausente; 1 = presente).

Um ovipositor está presente nos Opiliones e em alguns Anactinotrichida – com a importante exceção dos Ixodida – bem como em parte importante dos Actinotrichida.

153. *Pênis* (0 = ausente; 1 = presente; 2 = “pênis” dos Actinotrichida).

Um pênis ocorre nos opiliões. Um órgão similar a um pênis também tem sido encontrada em alguns ácaros Acariformes. Mas essa estrutura intromitente é uma modificação do espermatopositor desses ácaros em um órgão copulatório não homólogo ao pênis do primeiro grupo. A codificação adotada aqui reconhece isso e codifica os dois caracteres como estados separados. Dentre os Acariformes, a presença de tal estrutura nos Astigmata e Eleutherengona, não é monofilética. De qualquer forma não é feita aqui tal distinção *a priori*, e codificamos o estado 2 para Astigmata, Cheyletidae,

Tetranychoida e Stigmaeidae. Os ácaros Anactinotrichida não possuem nada que se assemelhe a um pênis, e qualquer tentativa de usar a presença de um pênis para unir Opiliones e Acari é errônea.

154. *Órgão copulatório no palpo do macho* (0 = ausente; 1 = presente).

Transferência direta de esperma através do órgão palpal de machos maduros é uma clara autapomorfia da ordem Araneae.

155. *Mecanismo de transferência de esperma associado à perna 3* (0 = ausente; 1 = presente).

Funcionalmente similar ao órgão palpal (veja acima), a presença de um mecanismo para a transferência direta de esperma é uma autapomorfia da ordem Ricinulei.

156. *Espermatóforos pedunculados* (0 = ausente; 1 = presente).

Alberti (2000) comentou a possibilidade de algum tipo de espermatóforo ser característica do plano básico dos Arachnida, mas notou as dificuldades de definir exatamente o que constituiria esse espermatóforo. Scorpiones, Pseudoscorpiones, Amblypygi, Uropygi e Schizomida transferem esperma via um espermatóforo pedunculado, e.g. Shultz (1990, caráter 57). Dentre os ácaros, a maioria dos Acariformes produz espermatóforos pedunculados enquanto a maioria dos Anactinothrichida apresenta espermatodactilia como modo de inseminação. O método exato de transferência de esperma nos Opilioacariformes e Holothyrida permanece desconhecido.

157. *Recolhimento do espermatóforo* (0 = sem corte; 1 = corte “face a face”; 2 = desfile de acasalamento).

Vários aracnídeos possuem comportamentos de cópula ritualizados ou danças. Nos escorpiões e Amblypygi, o macho conduz a fêmea sobre o espermatóforo com os dois animais face a face. Isso é frequentemente chamado como ‘promenade-de-deux’ em escorpiões e é codificado aqui com o mesmo estado de caráter que o dos Amblypygi, apesar de detalhes do comportamento diferir. Pseudoscorpiones são mais diversos a esse respeito. Alguns grupos basais simplesmente abandonam seus espermatóforos e, a rigor, não apresentam comportamento de corte (*cf.* Weygoldt, 1969; Alberti, 2000). Outros apresentam comportamento de corte similar àquele dos escorpiões. Codificou-se todos os pseudoescorpiões como 0/1 a esse respeito. Um comportamento identificado para Uropygi e Schizomida é o que Weygoldt (1978) chamou de ‘desfile de acasalamento’ (veja também Shultz, 1990, caráter 58) em que a fêmea agarra o opistossoma do macho e é puxada para cima de um espermatóforo previamente depositado. Esse caráter é inaplicável a grupos em que não há uso de espermatóforos. Os comportamentos de corte dos Acariformes são diversos demais para permitir uma codificação informativa.

158. *Testículos* (0 = sem um epitélio glandular; 1 = epitélio glandular diferenciado). Alberti & Peretti (2002) descreveram similaridades potencialmente apomórficas na morfologia dos testículos dos Solifugae e Actinotrichida, mas não entre os Anactinotrichida e os ácaros. Em detalhes, eles observaram que nos dois grupos existe uma área glandular bem diferenciada, que produz secreções que compõem o espermatóforo, o que não foi observado em nenhum outro aracnídeo.

159. *Glândulas acessórias tubulares* (0 = ausente; 1 = presente).

Essas glândulas ocorrem entre os aracnídeos apenas nos sistemas genitais de Amblypygi, Uropygi e Schizomida (Alberti, 2000, 2005), e assim são uma possível apomorfia de Pedipalpi.

160. *Saco de ovos* (0 = ausente; 1 = presente).

Pseudoscorpiones, Amblypygi, Uropygi e Schizomida produzem um saco de ovos – ou no caso dos pseudoescorpiões, embriões – onde mantém a prole até a eclosão; e.g. Shultz (1990, caráter 59) e Shultz (1999, caráter 32 [erroneamente numerado no original]).

Morfologia dos espermatozóides

161. *Flagelo* (0 = presente; 1 = ausente).

Os espermatozóides são supostos como plesiotipicamente flagelados, uma forma de propulsão eficiente no ambiente aquático, cenário da evolução inicial dos Metazoa. A perda do flagelo parece associada à evolução dos vários mecanismos de inseminação que apareceram nos aracnídeos e está completamente ausente em parte dos opiliões, nos dois grupos de ácaros, em Solifigae e Palpigradi.

162. *Espermatozóides enovelados* (0 = presente; 1 = ausente).

Presentes nos Pseudoescorpiões, Tetrapulmonata e Ricinulei. O caráter é inaplicável a grupos destituídos de flagelo.

163. *Arranjo dos microtúbulos no axonema* (0, 9 + 0; 1, 9 + 1; 2, 9 + 2; 3, 9 + 3; -, inaplicável, devido à ausência de flagelo)

O arranjo $9 \times 2 + 3$ dos microtúbulos no axonema dos espermatozóides é considerado uma convincente sinapomorfia de Tetrapulmonata (Alberti, 2000, 2005 e referências ali contidas). Note que alguns grupos de aranhas apresentam desvios consideráveis desse padrão; e.g. Michalik & Alberti (2005).

164. *Núcleo com aspecto espiralado* (0 = ausente; 1 = presente).

Essa morfologia particular do núcleo foi sugerida por Alberti (2000, 2005) como uma apomorfia potencial de “Labellata” (Araneae + Amblypygi). Pseudoscorpídeos também possuem o núcleo espiralado, mas esse formato é derivado de uma faixa espiral peculiar. Isso leva a questões a respeito da homologia do caráter nos três grupos e nos leva a codificar esse caráter como ambíguo em Pseudoscorpiones.

165. *Porção pós-centriolar do núcleo* (0 = não-modificado; 1 = assimétrico, alongado).

Essa última condição foi proposta como uma apomorfia potencial para o clado (Araneae + Amblypygi) por Alberti (2000, 2005).

166. *Fossa de implantação* (0 = rasa; 1 = profunda).

Nos aracnídeos, a fossa de implantação do flagelo, isto é, a parte posterior do núcleo que usualmente contém o centríolo e seus derivados (Alberti, 2000), normalmente é raso, mas em muitas aranhas e Schizomida ela é profunda e faz do espermatozóide quase um tubo oco. Naturalmente, esse caráter é inaplicável a grupos com espermatozóides afalagelados.

167. *Feixe de microtúbulos* (0 = ausente; 1 = presente).

Alberti (2000) notou que um feixe associado ao núcleo, e talvez com a função de dar uma forma definida a este, é conhecido apenas em Ricinulei e Tetrapulmonata; veja também Giribet *et al.* (2002, caráter 193).

168. *Carioteca* (0 = ausente; 1 = presente).

A membrana nuclear desaparece ao fim da espermiogênese em Xiphosura, Solifugae e Actinotrichida, dentre os ácaros (Alberti 1995, 2000).

169. *Túnel flagelar* (0 = ausente; 1 = presente).

Esse túnel, que envolve o axonema, persiste durante a espermiogênese apenas nos escorpiões e pseudoscorpíões (e.g. Alberti, 2000); veja também Giribet *et al.* (2002, caráter 203).

170. *Espermatozóide vacuolado* (0 = ausente; 1 = presente).

Alberti (2000, especialmente fig. 33) descreveu as diferenças fundamentais entre os espermatozóides dos ácaros Anactinotrichida e Actinotrichida. Ele, dessa maneira, concluiu que os espermatozóides não oferecem caracteres em suporte ao monofiletismo de Acari. A presença de espermatozóides vacuolados é uma característica presente em todos os grandes grupos de Anactinotrichida, com modificações profundas em alguns Mesostigmata, mas não entre os ácaros inclusos nas análises apresentadas aqui.

Embriologia/Desenvolvimento

171. *Ovos* (0 = centrolécitos; 1= isolécitos ou telolécitos).

Yoshikura (1975, tabela 1) descreveu os ovos da maioria dos aracnídeos como centrolécitos. Os ovos dos escorpiões e pseudoescorpiões são bem diferentes e apresentam redução na quantidade de vitelo. Relacionou essa redução à ovoviparidade e viviparidade dos escorpiões e à retenção dos ovos na bolsa característica dos pseudoescorpiões, ambas as adaptações para diminuir a dependência dos embriões do vitelo dos ovos.

172. *Região de crescimento* (0 = dando origem à maior parte do prossoma e ao opistossoma; 1 = dando origem apenas ao opistossoma).

Anderson (1973) e Yoshikura (1975) descreveram uma diferença fundamental entre o processo de desenvolvimento do opistossoma nos Xiphosura e escorpiões, por um lado, e os demais quelicerados, por outro. No primeiro, a região de crescimento dá origem aos dois tagmas; no segundo, o prossoma desenvolve-se diretamente do blastoderme. (veja também Giribet *et al.*, 2002, caráter 192).

173. *Larva hexápoda* (0 = ausente; 1 = presente).

Larvas com três pares de pernas são uma das mais importantes sinapomorfias propostas para sustentar a associação dos dois grupos de ácaros e Ricinulei (Lindquist, 1984, Shultz, 1990, caráter 61). Apesar de que, a julgar pelos Pycnogonida, a adição de pernas e segmentos ao corpo pode ser uma característica plesiomórfica.

174. *“Dente do ovo” na coxa do pedipalpo* (0 = ausente; 1 = presente).

Yoshikura (1975) observou várias estruturas serrilhadas nos aracnídeos que provavelmente auxiliam na eclosão. Destas, um par de projeções restritas à superfície dorsal das coxas do palpo e que são eliminadas depois da eclosão, foram mencionadas

como uma possível apomorfia de Araneae e Amblypygi (também Wheeler & Hayashi, 1998, caráter 32). Não é claro o quanto essas estruturas foram investigadas em outros grupos.

175. *Órgãos laterais* (0 = ausente; 1 = presente).

Caráter algo problemático, uma vez que os órgãos laterais que aparecem durante o desenvolvimento embrionário de Solifugae, Amblypygi, Uropygi e os órgãos de Claparède dos Actinotrichida (Yohshikura 1975; Thomas & Telford 1999) podem ser a retenção plesiomórfica do exopodito da perna II. Existe uma estrutura com o mesmo nome em Xiphosura, mas Thomas & Telford (1999) questionaram sua homologia com a estrutura aqui codificada, uma vez que não está associada com a perna II, mas com a carapaça. Aqui os Xiphosura são codificados com o estado 0 para esse caráter.

Ecologia

176. *Habitat* (0 = aquático; 1 = terrestre; 2 = adultos límnicos).

Existe uma longa disputa entre os neontologistas e paleontologistas que investigam os aracnídeos a respeito do verdadeiro habitat dos escorpiões do Paleozóico. De qualquer forma, é difícil explicar como, por exemplo, *Paleoscorpius devonicus* seria o único representante terrestre da numerosa fauna fóssil da ardózia de Hünsruck. Quanto aos animais vivos, apenas Pycnogonida, Xiphosura e a família Halacaridae são verdadeiramente marinhos. Os ácaros Hydrachnidia são aquáticos quando adultos, mas apresentam larvas parasitárias, geralmente de insetos holometábolos que emergem da água doce. Eles são codificados aqui em uma categoria separada.

177. *Larva parasita heteromórfica* (0 = ausente; 1 = presente).

O ciclo de vida em que uma larva parasita obrigatória ocorre é uma provável sinapomorfia de Parasintegona dentre os ácaros Prostigmata.

178. “*Hypopi*” (0 = ausente; 1 = presente).

O estágio de deutoninfa nos Astigmata apresenta partes bucais reduzidas e mecanismos para prender-se a outros organismos para dispersão por forese. Ese traço é exclusivo aos Astigmata (*Sancassania* e *Rhizoglyphus*, dentre os clados aqui amostrados).

Capítulo 3. Espermatologia comparada dos Halacaridae

Abstract

Ultrastructural observations on spermiogenesis, sperm cell and reproductive system of sixteen species belonging to Halacaridae are presented: *Acarothrix* sp., *Copidognathus* sp., *Copidognathus floridensis* (Newell, 1947), *Copidognathus tupinamborum* (Pepato & Tiago, 2005), *Copidognathus brachystomus* Viets, 1940 (Copidognathinae); *Agauopsis* sp. (grupo *brevipalpus*), *Arhodeoporus gracilipes* (Trouessart, 1889), *Halacaroides* sp. nov., *Halacaropsis hirsuta* (Trouessart, 1889), *Halacarus actenos* Trouessart, 1889 (Halcarinae); *Agaua panopae* (Lohmann, 1893) (Halixodinae); *Lohmannella rectangulops* Newell, 1984 (Lohmannellinae); *Isobactrus uniscutatus* (Viets, 1939), *Rhombognathides seahami* (Hodge, 1860), *Rhombognathus levigatoides* Pepato & Rocha, 2007 (Rhombognathinae) and *Acaromantis vespucioi* Pepato & Tiago, 2004 (Simognathinae). The gathered evidence does not support any close association of Hydrovolziidae or Hydrachnidia with Halacaridae, due the presence of spermatological apomorfies in the former such as the absence of an acrossomal filament and the presence of a granular field in the mature sperm cells. The data do not allow proposing any hypothesis on the placement of halacarid mites among Prostigmata. The espermatological information supports a basal position for genus *Rhombognathus*, which presents a diffuse pattern of chromatin condensation and crested mitochondria, instead the derivate centripetal pattern and modified mitochondria observed in the mature sperm cells of remaining clades. The Rhombognathinae polyphyly is further suggested by the specific morphology of the acrossomal filament shared by *Rhombognathides* and *Agaua*, which winds close to sperm cell surface. Spermatological data also supports a close relationship between the genus *Arhodeoporus* and Copidognathinae. Both groups share identical spermiogenesis, and putative

synapomorphies like the relatively small-sized acrosomal vesicle and eccentric chromatin body placement. Finally, the lost of track between the acrosomal vesicle and chromatin body during the spermiogenesis and the presence of invaginations filled with dark stained material in the basal portion of the sperm cells support a sister group relationship between the genera *Halacarus* and *Thalassarachna*.

Resumo

São apresentados dados a respeito da espermiogênese, a morfologia dos espermatozóides e ultraestrutura do sistema reprodutor de dezesseis espécies pertencentes à família Halacaridae: *Acarothrix* sp., *Copidognathus* sp., *Copidognathus floridensis* (Newell, 1947), *Copidognathus tupinamborum* (Pepato & Tiago, 2005), *Copidognathus brachystomus* Viets, 1940 (Copidognathinae); *Agauopsis* sp. (grupo *brevipalpus*), *Arhodeoporus gracilipes* (Trouessart, 1889), *Halacaroides* sp. nov., *Halacaropsis hirsuta* (Trouessart, 1889), *Halacarus actenos* Trouessart, 1889 (Halcarinae); *Agaue panopae* (Lohmann, 1893) (Halixodinae); *Lohmannella rectangulops* Newell, 1984 (Lohmannellinae); *Isobactrus uniscutatus* (Viets, 1939), *Rhombognathides seahami* (Hodge, 1860), *Rhombognathus levigatoides* Pepato & Rocha, 2007 (Rhombognathinae) e *Acaromantis vespucioi* Pepato & Tiago, 2004 (Simognathinae). Os dados espermatólogicos reunidos permitem excluir uma associação mais próxima entre Hydrovolziidae e Hydrachnidia com Halacaridae, apesar de não fornecer novas evidências a respeito de um possível grupo-irmão de Halacaridae ou a respeito da monofilia da família. Eles suportam uma posição basal para o gênero *Rhombognathus*, que mantém as cristas mitocondriais nos espermatozóides maduros, e apresenta um padrão difuso de condensação da cromatina, em oposição ao padrão centrípeto de condensação, condição derivada encontrada nas demais espécies da família. Além disso,

o polifiletismo de Rhombognathinae é sugerido pela morfologia específica do filamento acrossomal em *Agaue* e *Rhombognathides*, que compartilham numerosas dobras desse filamento junto à superfície do espermatozóide maduro. Os dados da espermatologia também indicam que *Arhodeoporus* deve ser considerado como mais proximamente relacionado a Copidognathinae que aos demais Halacarinae, devido à idêntica espermiogênese e morfologia do espermatozóide maduro, que incluem claras apomorfias como a pequena (em relação ao diâmetro do núcleo) vesícula acrossomal e a posição excêntrica do núcleo. Finalmente, a separação, durante a espermiogênese, da vesícula acrossomal do corpo de cromatina, e a presença de invaginações preenchidas por material eletrodenso na metade basal do espermatozóide suportam uma relação de grupo-irmão entre *Halacarus* e *Thalassarachna*.

3.1. Introdução

3.1.1. Morfologia funcional dos espermatozóides dos ácaros Actinotrichida

Quando observamos a distribuição da diversidade morfológica dos espermatozóides entre os animais, percebemos que em quase todas as principais linhagens temos o tipo flagelado, ou aquático, ocorrendo nos grupos basais e uma maior diversidade, com a ocorrência de espermatozóides aflagelados, por exemplo, em linhagens mais derivadas (Baccetti, 1979).

Dentre os quelicerados, os Xiphosura são os únicos dotados de espermatozóides que correspondem ao tipo plesiotípico acima referido. O modo de transferência de espermatozóides não é claro em Pycnogonida. Nesse grupo, a morfologia do axonema das espécies estudadas sugere que a motilidade dos seus espermatozóides é reduzida (van Deurs, 1974 a,b). Assim, os espermatozóides dos Xiphosura são um ponto de

partida útil para a compreensão da morfologia funcional dos ácaros Actinotrichida- e Solifugae, como discutido no capítulo anterior– dentre os quais se incluem os ácaros Halacaridae.

Em *Tachypleus gigas*, por exemplo, os espermatozóides possuem um complexo acrossomal composto por uma vesícula acrossomal e um longo filamento acrosomal que, após atravessar o núcleo, enrola-se na porção basal da célula. Mitocôndrias com poucas cristas distribuem-se pelo citoplasma de forma irregular. A motilidade do espermatozóide é garantida pelo flagelo que apresenta uma cavidade de implantação cônica e é associada a dois centríolos em disposição ortogonal (Alberti & Janssen, 1986).

O complexo acrossomal possui uma vesícula acrossomal, cujo conteúdo é secretado por um complexo de Golgi que se posiciona a meio caminho entre o núcleo e a superfície celular no início da espermiogênese, como descrito, por exemplo, por Callaini & Dallai (1993) para os pseudoescorpiões. A vesícula acrossomal é preenchida por enzimas digestivas, que cumprem o papel de abrir caminho em direção ao óvulo. Em Xiphosura, como provavelmente nos demais quelicerados com o complexo acrossomal completo, o mecanismo de reação acrossomal também inclui a descarga do filamento acrossomal que perfura o óvulo graças à energia elástica mantida pela configuração dos filamentos de actina que o compõem (Shin *et al.*, 2003). Geralmente, a reação acrossomal é mediada por mecanismos de reconhecimento intercelular (Valcquier, 1998).

Essas estruturas, que estão relacionadas ao momento mesmo da fecundação, ocorrem de maneira pouco modificada, se comparadas com Xiphosura, em vários representantes dos Actinedida, como nas famílias Saxidromidae, Bdellidae, Anystidae, Erythraeidae Calyptostomidae, Trombidiidae, Raphignathidae, Stigmaeidae e

Demodicidae (Alberti, 1991; Alberti & Coons, 1999; Alberti *et al.*, 2007). Nos Hydrachnidia o filamento acrossomal é ausente, ainda que a vesícula esteja presente e às vezes bem desenvolvida (Alberti *et al.*, 2008). Nos Sarcoptiformes, Nanorchestidae, Nicoletiellidae, Linopodidae e Tetranychidae o complexo acrossomal falta completamente (Alberti, 1980, 1991; Alberti & Coons, 1999).

Mas a reação acrossomal e a fecundação são os últimos passos de um caminho bem mais longo. Antes deles, o espermatozóide deve ser capaz de permanecer viável desde sua liberação pelo macho, submetido assim às forças seletivas relacionadas ao meio em que se dá a transferência de gametas e ao ambiente interno da fêmea.

Diferente dos Xiphosura, em que a fecundação é externa, a maioria dos ácaros Actinotrichida apresenta transferência indireta de espermatozoides, mediada por espermatóforos, ainda que a transferência direta por espermatoactilia ou “penis” também ocorra no grupo (Evans, 1992; Alberti & Coons, 1999). Nesse caso, a mobilidade do espermatozóide durante o seu trajeto até o trato genital da fêmea perde importância, ao que se atribui frequentemente a evolução de espermatozoides aflagelados (e.g. Baccetti, 1979).

No caso dos Halacaridae, transferência de espermatozoides dá-se por espermatóforos pedunculados, cujas descrições foram feitas por Pahnke (1974), para *Isobactrus uniscustatus* (Viets, 1939), *I. levis* (Viets, 1927), *Rhombognathides mucronatus* (Viets, 1927), *R. pascens* (Lohmann, 1889), *Metarhombognathus armatus* (Lohmann, 1893), *Halacarellus subterraneus* (Schulz, 1933), *H. petiti* (Angelier, 1950), (identificado incorretamente pela autora como *H. balticus* (Lohmann, 1889)), *H. capuzinus* (Lohmann, 1893), *Lohmannella falcata* (Hodge, 1863) e também para uma espécie que permaneceu não publicada, referida por Pahnke (1974) como *Halacerellus boettgeri* (nomen nudum). Kirchner (1967) descreveu o espermatóforo de

Thalassarachna basteri. Nas duas publicações os espermatóforos da maioria das espécies foram encontrados em grupos formando campos dessas estruturas. Nas espécies pertencentes à subfamília Rhombognathinae, no entanto, os espermatóforos foram encontrados ligados pela base, formando estruturas semelhantes a buquês.

Witte (1991) documentou os mesmos padrões em Hydrachnidia e argumentou que o agrupamento de espermatóforos está relacionado à potencialização da sinalização da sua presença por ferômonios.

Os dois autores também observaram a deposição de espermatóforos. Pahnke (1974) notou que a deposição de espermatóforos não está relacionada à presença de fêmeas nas culturas de *Halacarellus sp. (boettgeri, nomen nudum)* e *H. balticus*, que ocorre prontamente mesmo em ácaros em completo isolamento. Já Kirchner (1967) observou que a deposição dos espermatóforos por *T. basteri* não acontece em machos completamente isolados e ocorre em uma velocidade menor quando apenas machos estão presentes na cultura. Pahnke (1974) relacionou essas observações à densidade populacional dessas espécies, sugerindo que espécies que ocorrem em densidades altas apresentem o primeiro comportamento. Sugeriu também que existe na família Halacaridae um gradiente entre esse comportamento e a formação de pares para a transferência de espermatóforos (sugerida pela autora para *L. falcata*).

Newell (1984) descreveu espermatóforos presos à placa ocular em fêmea de *Rhombognathus darwini* Newell, 1984 e em pernas e corpos de machos e fêmeas de *Agaue setalis* Newell, 1984. Mas esses achados foram feitos em animais fixados, não sendo possível determinar se a deposição desses espermatóforos foi acidental ou relacionada a algum comportamento de corte.

A dependência da presença de fêmeas para a postura certamente é útil por diminuir o tempo durante o qual os espermatóforos ficam expostos ao ambiente. Mas

por curto que seja, os espermatozóides devem ser capazes de manter a viabilidade durante esse período. Para isso, as secreções que acompanham os espermatozóides parecem cumprir um papel decisivo. Witte (1991), por exemplo, notou que em alguns prostigmatas terrestres, essas secreções exibem propriedades higroscópicas, evitando a dessecação do espermatóforo.

Finalmente, após o transporte e no interior da fêmea, o espermatozóide passa pelo processo de capacitação, isto é, passa por uma série de modificações que permitem que ele adquira a capacidade de fertilizar o oócito (Bacceti & Afzelius, 1976). Essas mudanças podem ocorrer apenas em nível molecular como nos mamíferos, ou envolver mudanças morfológicas profundas.

Nos Actinotrichida em que esse processo é documentado, os espermatozóides assumem aspecto irregular, com projeções da superfície da célula que possuem numerosos túbulos e filamentos sob a membrana. É sugerido que as dobras da superfície da membrana presentes na maioria dos Actinotrichida contribuam para essas mudanças morfológicas que acompanham a capacitação (Alberti & Coons, 1999). Aparentemente, as células adquirem movimento amebóide, de forma que para o percurso no interior da fêmea essas especializações da membrana substituem o flagelo no papel de propulsor do espermatozóide.

3.1.2. Visão geral do trato reprodutor masculino dos ácaros Halacaridae

O sistema reprodutor dos Halacaridae foi estudado empregando-se microscopia de luz por Thomae (1926) e Pahnke (1974). Esse sistema compreende um par de testículos, um par de vasos deferentes que se unem em um vaso deferente que se continua como um ducto ejaculatório. Este último, parte de uma estrutura complexa, que inclui numerosos músculos e escleritos que dão forma ao espermatóforo. Pouco se sabe a respeito da regionalização desses dutos. Em Trombiculidae, no percurso do esperma e

durante a formação do espermatóforo, o epitélio dos dutos contribui com secreção de substâncias componentes do espermatóforo e reabsorção de água (Witte 1975).

Como discutido no capítulo precedente, Solifugae e Actinotrichida compartilham o plano de organização dos testículos. A divisão em duas regiões, uma glandular composta por várias células com aparato de síntese protéica muito bem desenvolvido e outra germinativa, que contém os espermatídeos, é evidente em todos os Halacaridae estudados.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Táxons amostrados

A diagnose da família Halacaridae baseia-se em um conjunto bem definido de caracteres considerados apomórficos, como a ausência de setas no podômero proximal da quelícera, ausência de tricobótrias no prodorso (ainda que o primeiro par de setas dorsais possa ser mais longo que os demais), presença de quatro placas dorsais (secundariamente fusionadas ou reduzidas), glândulas dermais presentes apenas no dorso do idiossoma. A classificação em subfamílias, no entanto, permanece por ser posta em um contexto cladístico. A classificação proposta por Bartsch (1983) permanece a melhor tentativa de sumarizar o conhecimento corrente e é seguida aqui, como ligeiramente modificada em Abe (1998), apesar de baseada em critérios fenéticos.

A tabela I lista as espécies que tiveram a espermatologia e a morfologia dos espermatozóides investigadas. Os dados de coleta foram detalhados no capítulo introdutório.

Tabela I. Espécies utilizadas no presente trabalho.

Família Halacaridae Murray, 1877

Subfamília Copidognathinae Bartsch, 1983

Gênero *Acarothrix* Bartsch, 1990

Acarothrix sp.

Gênero *Copidognathus* Trouessart, 1888

Copidognathus floridensis (Newell, 1947)

Copidognathus tupinamborum (Pepato & Tiago, 2005)

Copidognathus brachystomus Viets, 1940

Copidognathus sp.

Subfamília Halacarinae Viets, 1927

Gênero *Agauopsis* Viets, 1927

Agauopsis sp. (grupo *brevipalpus*)

Gênero *Arhodeoporus* Newell, 1947

Arhodeoporus gracilipes (Trouessart, 1889)

Gênero *Halacaroides* Bartsch, 1981

Halacaroides sp. nov.

Gênero *Halacaropsis* Bartsch, 1986

Halacaropsis hirsuta (Trouessart, 1889)

Gênero *Halacarus* Gosse, 1855

Halacarus actenos Trouessart, 1889

Subfamília Halixodinae Viets, 1927

Gênero *Agaue* Lohmann, 1889

Agaue panopae (Lohmann, 1893)

Subfamília Lohmannellinae Viets, 1927

Gênero *Lohmannella* Trouessart, 1901

Lohmannella rectangulops Newell, 1984

Subfamília Rhombognathinae Viets, 1927

Gênero *Isobactrus* Newell, 1947

Isobactrus uniscutatus (Viets, 1939)

Gênero *Rhombognathides* Viets, 1927

Rhombognathides seahami (Hodge, 1860)

Gênero *Rhombognathus* Trouessart, 1888

Rhombognathus levigatoides Pepato & Rocha, 2007

Subfamília Simognathinae Viets, 1927

Gênero *Acaromantis* Trouessart & Neumann, 1893

Acaromantis vespucioi Pepato & Tiago, 2004

3.2.2. Técnicas de microscopia eletrônica de transmissão

Os indivíduos foram fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato (0,1 M, pH 7,2 com a osmolaridade acertada com sacarose a 0,6 M) e colocado em um banho de gelo por 2 horas.

Após a imersão no fixador, eles tiveram suas pernas e gnatossoma retirados ou o corpo seccionado, já que o exoesqueleto fortemente esclerotizado impediria a penetração dos fixadores e uma inclusão adequada. Em seguida foram lavados com a mesma solução tampão e mergulhados em tetróxido de ósmio 2% diluído na mesma solução tampão por 2 horas. O material foi novamente lavado na solução tampão e imerso em solução aquosa de acetato de uranila durante 12 horas.

Os exemplares foram desidratados em uma série crescente de etanol seguida pela imersão em óxido de propileno e em mistura de óxido de propileno e resina epóxi usados como intermediários. Para a polimerização da resina, realizada a 70°C, foram necessárias 36 horas.

Foram feitos cortes finos (0,5 µm) corados com azul de toluidina destinados à microscopia óptica a fim de selecionar regiões de interesse à microscopia eletrônica. Os cortes ultrafinos (65 nm) foram feitos com o uso de um ultramicrotomo Leica Ultracut R, coletados em grades para microscopia eletrônica e contrastados com citrato de chumbo. As observações foram feitas sob um microscópio eletrônico Zeiss LEO 906E (Instituto Butantã) ou Zeiss M900 (IBUSP).

3.3. Resultados

A fim de facilitar a compreensão do impacto das observações morfológicas aqui apresentadas, cada seção descritiva virá acompanhada por comentários a respeito dos caracteres diagnósticos das subfamílias e gêneros. As espermiogênese de cada espécie é dividida em estágios arbitrários a fim de facilitar sua descrição.

Subfamília Copidognathinae Bartsch, 1983

Bartsch (1983) propôs a subfamília Copidognathinae a fim de acomodar aqueles halacarídeos que compartilhassem a presença de um único estágio ninfal (protoninfa), palpos com 3 ou 4 segmentos inseridos lateralmente ao gnatossoma, segundo segmento do palpo ou área equivalente sem setas e uma ou nenhuma seta no esclerito genital. A subfamília inicialmente incluía os gêneros *Copidognathides* Bartsch, 1976 (3 spp.); *Copidognathus* Trouessart, 1888 (359 spp.); e *Werthella* Lohmann, 1907 (10 spp.). Os gêneros *Acarothrix* Bartsch, 1990 (5 spp.) e *Phacacarus* Bartsch, 1992 (1 sp.) foram adicionados posteriormente (Bartsch, 1990, 1992, 2009).

O gênero *Copidognathus* é o mais diversificado, incluindo um terço de todas as espécies descritas de Halacaridae. Ácaros pertencentes a esse gênero ocupam todos os ambientes marinhos e profundidades, bem como ambientes estuarinos e límnicos e algumas espécies são encontradas em associação com decápodes (Bartsch, 1999, Pepato *et al.*, 2005).

O gênero *Acarothrix* por outro lado é pouco diversificado, possui suas ocorrências concentradas nos trópicos, em particular no hemisfério sul e restritas a ambientes estuarinos. Uma característica distintiva única, mas claramente relacionada a esse ambiente é a presença de um par de acetábulos genitais externo aos escleritos genitais do macho (Bartsch, 2006).

A presença de um único estágio ninfal é a única característica diagnóstica da subfamília, que pode ser considerada como uma inequívoca sinapomorfia, ainda que o estado do caráter também esteja presente no gênero *Anomalohalacarus*.

Para o presente estudo foram amostradas quatro espécies pertencentes ao gênero *Copidognathus*, a saber, *C. floridensis*, *C. brachystomus*, *C. tupinamborum* e *Copidognathus* sp. Todas compartilharam com a única espécie de *Acarothrix* estudada até agora, espermiogênese, secreções acompanhantes e espermatozóides maduros muito semelhantes. Por isso, a descrição da espermiogênese dessas espécies será feita em conjunto.

Estágio 1. Os espermátides iniciais possuem o citoplasma eletrodenso com várias mitocôndrias, longas cisternas do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e muitos poliribossomos (Fig. 2 A-C; 6A; 8 C). O núcleo apresenta grumos de heterocromatina. Tais características denotam uma célula em intensa atividade de síntese.

Estágio 2. Os espermátides apresentam acentuada expansão de volume celular (Fig. 2 A, 8 D). Foram encontrados poucos estágios intermediários como os vistos na Fig. 10 D, dando a impressão que essa expansão se dá rapidamente. Tanto o núcleo quanto o citoplasma aumentam seu volume. As mitocôndrias concentram-se próximas aos remanescentes do retículo endoplasmático, aparecem mais condensadas e menores. Entre as células desse estágio podem ser vistos numerosos processos celulares (Fig. 2 A).

Estágio 3. O espermátide alonga-se após a expansão referida no estágio anterior. No citoplasma, as organelas celulares desaparecem, e a célula parece vazia (Fig. 3 A), com a única exceção, das vesículas alongadas semelhantes a halteres e delimitadas por dupla membrana encontradas em *Copidognathus brachystomus* (Fig. 6 C). Essas estruturas parecem as predecessoras das cisternas achatadas e em íntimo contato com a membrana plasmática do espermátide tardio dessa espécie (Fig. 6 B). O

núcleo nesse estágio começa a se condensar junto à carioteca, processo do qual participam microtúbulos (Fig. 3 E); o núcleo se alonga junto com o restante da célula.

Estágio 4. A condensação do núcleo intensifica-se nesse estágio, a partir do qual o complexo acrossomal torna-se evidente. Este consiste de uma pequena vesícula acrossomal e um longo filamento acrossomal que atravessa o canal nuclear (Fig. 3 B, 8 A). A largura do canal nuclear é semelhante nas espécies de *Copidognathus*, mas de diâmetro bem maior em *Acarothrix*. Os túbulos eletrodensos que se iniciam como pequenas invaginações da membrana plasmática preenchidas com material denso se estendem pelo citoplasma (Fig. 3 C).

Estágio 5. O núcleo perde a carioteca quando a cromatina está completamente condensada. Assim, nos referimos a estrutura que o substituí como corpo de cromatina (Fig. 3 D, 4 A, 6 D, 10 B). As invaginações da membrana plasmática dobram-se sobre eles próprios, dando origem ao aspecto convoluto da periferia da célula no espermatozóide maduro. Em *C. brachystomus* há estreitas cisternas comprimidas contra a membrana plasmática (Fig. 6 B). Como discutido acima, elas parecem ter origem nas estruturas em forma de haltere vistas nos espermátides intermediários.

Espermatozóides maduros. Os espermatozóides maduros passam por um moderado processo de condensação citoplasmática e o núcleo, que até então se estendia pelo interior do citoplasma, assume uma posição periférica. Eles são liberados através da porção ventral da região germinativa do testículo no lúmen do testículo, que também recebe as secreções da porção ventral deste. (4 A, 11 C).

Secreções acompanhantes. Os espermatozóides das espécies estudadas de *Copidognathus* e *Acarothrix* são acompanhados por dois tipos de corpúsculos, um eletrotranslúcido e que tende a se ligar à superfície do espermatozóide e outro,

eletrodenso e de formato fusiforme, que tende a se distribuir ao acaso junto aos espermatozóides (4 C, 5 A, 7 A D, 9 A, 10 C, 11 E).

Os espermatozóides aparecem no vaso deferente em uma única grande massa. Sob ela, uma massa de secreção que contém em graus variáveis estruturas em pilha parcialmente circundadas por uma secreção homogênea (Fig. 4 B, 7 B, 9 C, 10 A, 11 D). É interessante notar que esta secreção varia bastante entre uma espécie e outra. Assim *Copidognathus floridensis* apresenta relativamente poucas pilhas de plaquetas, enquanto *Acarothrix*, *C. tupinamborum*, *C. brachystomus* e *Copidognathus* sp. nov. possuem mais plaquetas que a matrix que as circunda. Vale ainda notar que *Acarothrix* apresenta plaquetas bem menores que as das demais espécies.

Testículos e trato genital. Em todas as espécies estudadas, o testículo é composto por uma porção germinativa dorsal e outra secretora ventral (Fig 1). Os espermátides são encontrados embebidos no citoplasma do que parece ser uma única grande célula dorsal. Eles são ordenados grosseiramente do dorso para o ventre, com os espermátides mais avançados na porção ventral.

A porção secretora por sua vez, é composta por células que apresentam extenso aparato de síntese protéica: núcleos grandes, com cromatina pouco condensada e nucléolos bem desenvolvidos. No citoplasma, é encontrado extenso retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi (Fig. 7 C, 9 B, 11 A).

As secreções produzidas pela porção ventral são entregues ao lúmen que se encontra entre as duas porções do testículo, por microvilosidades mais ou menos extensas (Fig. 4 A, 7 C, 11 B, C). Já os espermatozóides são liberados no lúmen, provavelmente pela fragmentação do citoplasma da porção germinativa.

Após transitar por um par de *vasa deferentia* curtos, o esperma chega ao complexo ejaculatório por um vaso deferente. Esse vaso pôde ser observado em todas as

espécies estudadas e é aqui documentado para *Copidognathus floridensis* (Fig. 5 A) e *Copidognathus brachystomus* (Fig. 7 A). Trata-se de um tubo coberto com um epitélio fino (Fig. 5 B). O vaso deferente desemboca em um duto ejaculatório, em íntima associação com o esqueleto ejaculatório e com células que possuem processos citoplasmáticos que se insinuam na massa espermática (Fig. 10 A)

Subfamília Halacarinae Viets, 1927

A subfamília Halacarinae é diagnosticada apenas pela presença de palpos inseridos lateralmente e evidentes em vista ventral, e coloração do idiossoma variando do castanho claro ao marrom (Green & Macquitty, 1987). Na verdade, a subfamília é o produto da separação sucessiva das demais subfamílias, e inclui um conjunto extremamente heterogêneo de gêneros.

Gênero Agauopsis Viets, 1927

Agauopsis inclui correntemente 85 espécies válidas. É um gênero cosmopolita, ainda que a diversidade no hemisfério sul seja sensivelmente maior que a do hemisfério norte (Bartsch, 2006, 2009). É facilmente separado da maioria dos demais gêneros pelas pernas I hipertrofiadas e dotadas por fortes espinhos, o que empresta ao ácaro um aspecto similar ao dos ácaros da família Caeculidae. Esse caráter é compartilhado com as espécies de *Halacaropsis*, que, no entanto, foi desmembrado do gênero *Agauopsis* devido a diferenças observadas na quetotaxia e nas proporções dos artículos das pernas (Bartsch, 1996).

A espécie cuja espermiogênese pôde ser estudada em maior detalhe ainda não foi descrita. Foi coletada em um manguezal e pertence ao grupo de espécies *brevipalpus* (Bartsch, 2003).

Estágio 1. Os estágios mais precoces são espermatídeos iniciais caracterizados por citoplasma eletrodenso, com numerosos ribossomos livres e mitocôndrias com cristas bem desenvolvidas (Fig 12 A, B). Não foram encontrados complexos de Golgi em nenhum dos espermatídeos observados.

Estágio 2. A exemplo do observado em Copidognathinae, ocorre um aumento intenso do volume celular, afetando tanto o núcleo quanto o citoplasma (Fig. 12 B, C). As mitocôndrias assumem a posição periférica verificada daí em diante, mas não se apresentam modificadas exceto por uma sensível redução do volume (Fig. 12 C).

Estágio 3. Os espermatídeos passam por profunda modificação. O núcleo alonga-se e a condensação se inicia junto à carioteca (Fig. 13 A,B). Profundas invaginações da membrana plasmática insinuam-se em direção ao núcleo, distribuindo-se de forma uniforme por toda a célula. As mitocôndrias assumem aspecto anular, com um grande espaço entre as membranas interna e externa, e assumem uma forma mais alongada (Fig 13 C). Esse aspecto não se altera durante o restante da espermiogênese.

Espermatozóides maduros. O corpo de cromatina é fibroso ao final da espermiogênese (Fig. 14 A, C). Não há evidência da presença de um complexo acrossomal nos espermatozóides maduros ou espermatídeos observados. Como relatado em outras espécies, a condensação do citoplasma do espermatozóide parece ser concluída no lúmen do testículo.

Secreções acompanhantes. Os espermatozóides ficam imersos em uma massa composta por dois diferentes tipos de corpúsculos, um menor, eletrodenso, com uma porção mais eletrotranslúcida, e outro homogêneo, que aparece mais claro nas micrografias (Fig. 14 A). O primeiro tipo de corpúsculo aparece circundando cada espermatozóide; o segundo tem uma distribuição mais aleatória dentro da massa

espermática. Os espermatozóides e corpos de secreção estão imersos em uma matriz de material eletrodenso.

Testículos. A estrutura básica dos testículos dos ácaros Acariformes confirma-se aqui, com uma área secretora, rica em retículo endoplasmático rugoso e com extensa área de microvilosidades na sua porção apical (Fig 14 B, C). A ocorrência de complexos de Golgi é rara.

Gênero *Arhodeoporus* Newell, 1947

Três gêneros compartilham a maior parte das características diagnósticas com Copidognathinae: *Arhodeoporus* Newell, 1947, com 31 espécies; *Camactognathus* Newell, 1984, com três espécies; e *Winlundia* Newell, 1984, com duas (Bartsch, 2009). Eles apresentam palpos com 4 segmentos inseridos lateralmente ao gnatossoma, segundo segmento do palpo ou área equivalente sem setas, da mesma forma que em Copidognathinae. Retiveram, no entanto, o estágio de deutoninfa e apresentam uma seta a mais na porção ventral da tíbia e dois pares de setas no esclerito genital. Por isso foram mantidos na subfamília Halacarinae.

A espermiogênese na espécie estudada, *Arhodeoporus gracilipes*, é praticamente idêntica à descrita para as espécies do gênero *Copidognathus* e *Acarothrix*.

Estágio 1. Os espermátides iniciais encontrados apresentam o citoplasma eletrodenso e numerosas mitocôndrias (Fig. 15 A). O núcleo apresenta grumos de heterocromatina.

Estágio 2. Estágio em que os espermátides sofrem intensa expansão do volume celular, observado em Copidognathinae, não pôde ser documentado. O segundo estágio observado apresenta células alongadas (Fig. 15 B). O núcleo acompanha o formato da

célula e no seu interior é evidente o filamento acrossomal (Fig. 15 B). Organelas não foram encontradas nesse estágio no citoplasma, exceto por inúmeras inclusões amorfas e irregulares.

Estágio 3. A cromatina aparece como um anel eletrodenso na face interna da carioteca (Fig. 15 C). A célula começa a assumir um formato mais globular, e as inclusões acima referidas são frequentes na matrix citoplasmática.

Estágio 4. A espermiogênese termina com a cromatina completamente condensada e o desaparecimento total da carioteca (Fig 15 E). O complexo acrossomal, que pode ser visto na extremidade do núcleo, apresenta uma pequena vesícula acrossomal situada na extremidade de uma constrição apical do núcleo (Fig. 15 D). Na periferia da célula, aparecem invaginações da membrana plasmática preenchidas por material eletrodenso. Esses túbulos contraem-se em seguida, emprestando um aspecto convoluto à porção cortical da célula (Fig 15 E).

Espermatozóides maduros. Os espermatozóides maduros apresentam moderada condensação citoplasmática durante seu trajeto do lúmen do testículo (Fig 16 C) ao ducto ejaculatório (Fig. 16 B). Eles são de formato globular e oval e o núcleo encontra-se em posição excêntrica na célula, estendendo-se paralelamente à superfície de um dos seus polos.

Secreções acompanhantes. Da mesma forma que os espermatozóides, as secreções acompanhantes são similares àsquelas observadas nos ácaros *Copidognathinae*. São dois tipos diferentes de corpos de secreção: os “corpos complexos” fusiformes de secreção; e outros que aparecem proximamente aos espermatozóides, geralmente circundando-os.

A disposição dos espermatozóides e as secreções no vaso deferente também não diferem daquelas das espécies de *Copidognathus* e *Acarothrix*, com uma única e grande

gota de esperma sobre uma massa de secreção, a mais dorsal estruturada com pilhas de plaquetas dentro de uma matriz homogênea. Nesse caso, muito semelhante àquela de *Copidognathus floridensis*.

Trato reprodutor. Como em outras espécies, a porção posterior do testículo apresenta reentrâncias por onde passam fibras nervosas (Fig. 16 C). Ainda que não documentado aqui, os cortes dessa região apresentam sinapses relacionadas à musculatura associada ao esqueleto genital apenas. Assim, o testículo não é innervado.

Gênero *Halacaroides* Bartsch, 1981

O gênero *Halacaroides* compreende três espécies descritas, todas arenícolas e intersticiais (Bartsch, 2008). A espécie utilizada é nova e descrita em detalhes no próximo capítulo.

Estágio 1. Os espermátides iniciais são alongados. Os núcleos possuem grumos de heterocromatina. O citoplasma é de aspecto eletrodense (Fig. 18 C).

Estágio 2. As modificações que precedem o início do processo de condensação da cromatina não puderam ser observadas. No estágio documentado seguinte, a cromatina já se apresenta mais condensada junto à carioteca (Fig. 18E). O complexo acrossomal já está completamente formado. O citoplasma da célula assume um aspecto eletrotranslúcido, sendo percorrido por túbulos que partem da membrana plasmática.

Estágio 3. A cromatina já está completamente condensada e o envelope nuclear já foi perdido. Grupos de grânulos eletrodensos foram encontrados próximo ao núcleo (Fig. 18 A). Sua presença é transitória, não sendo encontrados nos espermátides tardios ou espermatozoides maduros. As mitocôndrias continuam presentes, porém modificadas em mitocôndrias anulares, sem cristas.

Estágio 4. Os espermátides tardios (Fig. 18 B) não apresentam mais os grânulos eletrodensos descritos acima, mas mantêm todas as demais características. Na Fig. 18 B, chama a atenção o espesso filamento acrossomal que faz contato com um relativamente abundante material sub-acrossomal.

Espermatozóides maduros. Os espermatozóides maduros passam por um intenso processo de condensação citoplasmática, a ponto de tornar irreconhecíveis muitas das estruturas descritas acima. Os túbulos que partem da superfície celular não são mais reconhecíveis como tal, emprestando à porção cortical da célula um aspecto convoluto (Fig. 9 A-C).

Secreções acompanhantes. Dentro do ducto ejaculatório, os espermatozóides podem ser observados sobre uma massa de secreção (17 A) cuja área central, é constituída de matriz pouco eletrodensa, contendo pilhas de plaquetas eletrodensas (Fig 19 A, D). Principalmente na porção ventral do ducto ejaculatório, onde se observam numerosos processos celulares, uma matriz de aspecto mais eletrodensa e amorfo pode ser vista.

Na gota de esperma propriamente dita, os espermatozóides estão embebidos em uma fina matriz que, além deles, contém dois tipos diferentes de corpos de secreção, um pequeno e heterogêneo e outro maior e uniformemente denso ao microscópio eletrônico (Fig 19 A-C). Os pequenos corpos de secreção podem ser encontrados livres, mas a maioria parece se ligar aos espermatozóides. Já os corpos maiores e escuros são encontrados em distribuição mais ou menos uniforme.

Como nas demais espécies, no lúmen do testículo os espermatozóides são encapsulados por uma capa de secreção que em *Halacaroides* frequentemente carrega inclusões eletrodensas (Fig 19 A, C). Ao que parece, essas inclusões são adicionadas à capa de secreção ainda no lúmen do testículo (Fig 18 D).

Testículos e trato genital. A estrutura do testículo inclui a região secretora ventral e germinativa dorsal comum aos Actinotrichida (Fig. 17 A). Na região secretora há extenso retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexos de Golgi. A Fig. 17 A mostra uma seção transversal pelo corpo do ácaro através do esqueleto genital. Pode-se ver alguns dos elementos do esqueleto ejacutório e músculos que atuam sobre este na produção do espermatóforo.

Gênero *Halacaropsis* Bartsch, 1986

As espécies que atualmente compõem *Halacaropsis* compartilham com *Agauopsis*, do qual foram separadas por Bartsch (1996), a perna I hipertrofiada e com fortes espinhos. Podem ser separadas de *Agauopsis* por possuírem 3-5 setas ventrais no Tarso I e pelas garras mediais bem desenvolvidas em todas as pernas. *Halacaropsis* inclui cinco espécies, sendo a espécie aqui empregada, *Halacaropsis hirsuta* (Trouessart, 1889), a espécie-tipo do gênero.

Estágio 1. Como em *Agauopsis* e *Copidognathus*, os estágios iniciais sofrem intensa expansão (Fig. 20 A). Ainda são evidentes no núcleo os grumos de heterocromatina.

Estágio 2. Os estágios iniciais da condensação nuclear não puderam ser observados. De qualquer forma, é evidente o padrão centrípeto de condensação (Fig. 20 C), com a cromatina acabando concentrada no polo oposto ao da vesícula acrossomal (Fig. 20 B). O citoplasma, pouco eletrodenso, é percorrido por finos túbulos formados por invaginações da membrana plasmática. O citoplasma deste estágio também apresenta mitocôndrias anulares junto ao núcleo da célula (Fig. 20 C).

Espermatozóides maduros. Os espermatozóides maduros no interior do lúmen, ainda não inteiramente condensados apresentam a região cortical com aspecto lamelar, pela presença das invaginações observadas nos estágios anteriores (Fig. 20 D). Ao completar a condensação citoplasmática, tais invaginações parecem enrolar-se sobre si mesmas (Fig. 21 C-D). O núcleo é alongado e dobra-se várias vezes sobre si próprio, como indicado pelo número de vezes em que ele é atravessado a cada corte (Fig. 21 A-D). Mitocôndrias são evidentes acompanhando o núcleo (Fig. 21 D). O complexo acrossomal é completo, incluindo um espesso filamento (Fig. 21 C). O formato do espermatozóide maduro é globular.

Secreções acompanhantes. É interessante notar que a capa de secreção que recobre cada um dos espermatozóides possui um espessamento junto ao acrossomo (Fig. 21 C). Espessamentos similares foram vistos em *Halacaroides*, mas nesta espécie nenhuma relação entre a sua presença e o acrossomo pôde ser inferida.

Os espermatozóides são unidos em agregados espermáticos por uma secreção amorfa e eletrodensa (Fig. 21 A, B). Esses agregados estão imersos no ducto ejaculatório formando uma massa composta por uma matriz fina e corpúsculos de secreção semelhantes a vesículas. Aparentemente, uma secreção composta por uma matriz estruturada em plaquetas alongadas e uma substância eletrodensa completam o conjunto de secreções acompanhantes encontrado (Fig. 21 A).

Testículos. Os testículos correspondem ao plano comum dos demais Actinotrichida. Chama a atenção a ausência de microvilosidades nas porções mais anteriores do testículo (Fig. 22 A). O citoplasma das células da região secretora apresenta mitocôndrias alongadas, complexos de Golgi, extenso retículo endoplasmático e inclusões, possivelmente grânulos de secreção (Fig. 22 A,B).

Halacarus inclui 75 espécies, a maioria das quais do hemisfério sul (Bartsch, 2009, 2006). Pode ser separado de outros grandes halacarídeos predadores (atingem até 1,5 mm), como *Halacarellus* e *Thalassarachna*, por possuírem duas setas no fêmur do palpo, a patela ter aproximadamente o mesmo comprimento da tibia ou telofêmur e cinco pares de poros glandulares dorsais conspícuos.

Estágio 1. Os espermátídeos iniciais encontrados são células que apresentam núcleo com grumos de heterocromatina e contorno regular. No citoplasma, pequenas vesículas, provavelmente mitocôndrias, puderam ser observadas (Fig. 23 A).

Estágio 2. Os espermátídeos deste estágio possuem aspecto drasticamente alterado, com áreas vacuolizadas na periferia da célula, a cromatina condensada em grandes grumos e de contorno irregular (Fig 23 B).

Estágio 3. Os espermátídeos já apresentam uma vesícula acrossomal bem desenvolvida em contato com um núcleo volumoso, no qual a cromatina se condensa junto ao envelope nuclear (Fig. 23 D).

Estágio 4. A célula é mais alongada, com contorno bastante irregular, e com longas projeções (Fig 23 C); a cromatina se concentra na porção basal do espermátídeo, distanciando-se da vesícula do acrossomo.

Estágio 5. O contorno dos espermátídeos, bastante alongados, torna-se mais regular (Fig. 24 A). Entre o corpo de cromatina e a superfície basal da célula desenvolvem-se cisternas paralelas.

Estágio 6. Vesículas fusiformes ficam encontram-se no citoplasma (as quais, por analogia com as outras espécies considerou-se ser mitocôndrias modificadas). Na

superfície da célula aparecem algumas alças que aparentemente se desenvolvem de fora para dentro a partir da membrana plasmática (Fig. 24 B).

Espermatozóide maduro. O espermatozóide maduro de *H. actenos* foi observado apenas na porção basal da região germinativa do testículo e no seu lúmen. Ele apresenta numerosas dobras da membrana plasmática, que parecem se desenvolver imediatamente antes da sua liberação no lúmen (Fig 24 C, E). Além disso, a metade basal do espermatozóide, na qual está localizado o corpo de cromatina, desenvolve o que, em cortes longitudinais, aparece como invaginações laterais preenchidas por material eletrodenso (Fig 24 E). A julgar por alguns espermatozoides em corte transversal, essas invaginações podem continuar em cisternas preenchidas de material eletrodenso, mas isso não pôde ser adequadamente documentado. O corpo de cromatina perde qualquer contato direto com a vesícula acrossomal, e o filamento acrossomal estende-se livre de qualquer material nuclear entre a vesícula acrossomal e o corpo de cromatina, como pode ser atestado pela Fig. 24 C, em que ele aparece interceptado pelo corte três vezes. As vesículas fusiformes, que se considerou tratar-se de mitocôndrias, distribuem-se entre o corpo de cromatina e a vesícula acrossomal.

Secreções acompanhantes. *Halacarus actenos* compartilha com as espécies dos gêneros *Arhodeoporus*, *Copidognathus* e *Acarothrix* a presença de corpos fusiformes de secreção (Fig. 24 D, E). Além disso, outros corpúsculos podem ser encontrados, como verificado na Fig. 24 D.

Testículos. O testículo corresponde ao plano geral observado nos demais halacarídeos, com a região secretora rica em microvilosidades (Fig. 24 D).

Subfamília Halixodinae Viets, 1927

A subfamília Halixodinae inclui os gêneros *Agaue* Lohmann, 1889, com 42 espécies descritas, *Bradyagaue* Newell, 1984, com dezessete, *Halixodes* Brucker & Trouessart, 1900, com três e *Parahalixodes* Laubier, 1960, com duas espécies descritas. A subfamília caracteriza-se pelas margens do rostrum paralelas, um caráter compartilhado, no entanto, por espécies externas à subfamília (Bartsch, 1983).

Gênero *Agaue* Lohmann, 1889

O gênero *Agaue* caracteriza-se pelo corpo e pernas frequentemente com lamelas elaboradas; palpo com quatro segmentos e inserção lateral; comprimentos somados dos terceiro e quarto artículos do palpo menor que o comprimento do segundo artículo, mas maior que 2/3 do comprimento deste (Bartsch, 2006). A descrição a seguir baseia-se no estudo de indivíduos pertencentes à espécie *Agaue panopae* (Lohmann, 1893).

Estágio 1. Os espermátides iniciais observados em *Agaue panopae* são células com citoplasma eletrodenso, contorno regular e núcleos grandes em relação ao tamanho da célula. Foram observados processos celulares entre grupos de espermátides (Fig. 25 A).

Estágio 2. As células exibem considerável aumento de tamanho e ficam com o contorno irregular. Os núcleos continuam apresentando grumos de heterocromatina (Fig. 25 B).

Estágio 3. O espermátide continua apresentando contorno bastante irregular e citoplasma eletrodenso. O núcleo, moderadamente alongado, apresenta a cromatina condensando-se junto à superfície interna da carioteca. O complexo acrossomal apresenta-se completo, com a vesícula acrossomal já formada e o filamento acrossomal atravessando o núcleo (Fig. 25C). Ao redor do núcleo, grânulos, aparentemente de glicogênio, podem ser vistos.

Estágio 4. Durante a condensação do núcleo, a superfície celular e o citoplasma passam por importantes transformações. Surgem invaginações tubulares da membrana plasmática que percorrem o citoplasma. Mitocôndrias alongadas aparecem junto ao núcleo, no qual ocorrem também grânulos, possivelmente de glicogênio (Fig. 25 D).

Estágio 5. Os espermatídeos avançados assumem formato globular alongado (Fig. 26 A-C). A vesícula acrossomal ocorre deslocada em direção a um dos pólos da célula e junto a ela foi observada a ocorrência de uma inclusão citoplasmática eletrodensa (Fig. 26 C). Mitocôndrias alongadas e sem cristas, observadas no estágio anterior são bastante evidentes. Os espermatídeos, mesmo separados pelo citoplasma da célula somática em que estão embebidos, mantêm contato através de longas pontes intercelulares (Fig 26 A) ou interdigitações (Fig. 26 C)

Espermatozóides maduros. Os espermatozóides maduros são alongados. No interior do lúmen, onde o processo de condensação citoplasmática não está completo, é evidente o filamento acrossomal, que dá várias voltas junto à periferia da célula (Fig. 26 E).

Secreções acompanhantes. Os espermatozóides, cobertos por um envoltório individual de secreção, estão imersos em uma fina matriz que contém corpúsculos similares a vesículas, compostos, aparentemente, por uma substância eletrodensa e outra translúcida. A gota de esperma está envolvida por uma secreção relativamente eletrotranslúcida que contém pequenas plaquetas eletrodensas (Fig. 27 C). Completando o conjunto de secreções observado, temos um material de aparência eletrodensa externo à essa última secreção (Fig. 27 B)

Trato genital. Observações detalhadas da região do vaso deferente imediatamente anterior ao duto ejaculatório puderam ser feitas nesta espécie. Os processos celulares que partem da base do duto, similar ao já observado para o duto

ejaculatório de *Copidognathus* sp., penetra profundamente na massa espermática (Fig. 27 A). O epitélio dessa região é duplo e, internamente em sua porção dorsal, possui microvilosidades (Fig. 27 B).

Subfamília Lohmannellinae Viets, 1927

A subfamília Lohmannellinae, à qual já se atribuiu a categoria de família (Newell, 1984, Harvey, 1990), distingue-se pela presença de palpos com dois a quatro artículos inseridos dorsalmente à base do gnatossoma; rostro longo, com aproximadamente o mesmo comprimento dos palpos; laterais do rostro paralelas na maior parte de seu comprimento. Inclui quatro gêneros marinhos: *Lohmannella* Trouessart, 1901 (36 spp.), *Scaptognathides* Monniot, 1972 (11 spp.), *Scaptognathus* Trouessart, 1889 (30 spp.), *Xenohalacarus* Otto, 2000 (1 sp.) e o gênero de água doce *Porolohmannella* Viets, 1929 (1 sp.) (Bartsch, 2009; Otto, 2000a).

Para a descrição dos espermatozóides, contou-se infelizmente apenas com um indivíduo de *Lohmannella rectangulops* Newell, 1984. Assim a escassez de material impediu uma descrição completa da espermiogênese.

Estágio 1. Os espermátides iniciais possuem o citoplasma eletrodenso e núcleo com grumos de heterocromatina. (Fig. 28 A). Não puderam ser encontradas mitocôndrias neste e nos estágios seguintes.

Estágio 2. Tanto o núcleo quanto o citoplasma aumentam consideravelmente de volume (Fig. 28 A, B). O citoplasma geralmente aparece com uma região translúcida junto à membrana plasmática, com maior parte de seu material em torno do núcleo.

Estágio 3. Os espermátides intermediários são alongados. Não é possível distinguir uma região onde a condensação da cromatina aconteça de forma mais intensa.

É possível, no entanto, perceber a presença do filamento acrossomal atravessando as células (Fig. 28 C).

Estágio 4. Aparecem invaginações simples (não preenchidas por material eletrodenso) da membrana plasmática conforme prossegue a condensação do núcleo (Fig. 28 D). A cromatina mostra um aspecto fibroso, não sendo possível distinguir com certeza um padrão centrípeto de condensação. Material granular, talvez glicogênio, é observado junto ao núcleo.

Estágio 5. O núcleo dos espermatídeos perde seu formato alongado e torna-se massa mais ou menos globular de aspecto fibroso. As invaginações da membrana plasmática tomam a quase totalidade do citoplasma (Fig. 29 B). O espermatozóide maduro e completamente condensado é coberto por uma camada de secreção e assume forma esférica (Fig 29A).

Espermatozóide maduro. O espermatozóide maduro possui forma regular e esférica, com um volumoso corpo de cromatina central do mesmo formato. O citoplasma aparece intensamente condensado.

Secreções acompanhantes. Os espermatozóides são acompanhados por dois tipos de corpos de secreção, um eletrotranslúcido e outro de aspecto granuloso. Os espermatozóides ocorrem isolados ou em pequenos grupos no interior do vaso deferente (Fig. 29 A). Preenchendo a maior parte do volume desse duto, há uma secreção de aspecto amorfo.

Testículos. Como nos demais ácaros examinados, o testículo apresenta uma porção ventral secretora, com células apicalmente dotadas de microvilosidades, notáveis nesse caso por serem particularmente longas (Fig. 30)

Subfamília Rhombognathinae Viets, 1927

Rhombognathinae é composta pelos gêneros *Isobactrus* Newell, 1947 (26 spp.), *Rhombognathides* Viets, 1927 (6 spp.), *Metarhombognathus* Newell, 1947 (2 spp.) e *Rhombognathus* Trouessart, 1888 (103 spp.). Abé (1998) revisou a subfamília, organizou uma matriz de trinta caracteres morfológicos e polarizou as árvores através de um ancestral hipotético. Rhombognathinae foi considerada como monofilética devido à coloração do corpo e pela presença de duas fileiras de apódemas filamentosos na placa faringeal.

Gênero *Isobactrus* Newell, 1947

A descrição a seguir refere-se à espécie *I. unicustatus*, comum em regiões estuarinas do norte da Europa. Segundo Abe (1998), as espécies de *Isobactrus* compartilham, como autapomorfias, o formato geral do corpo rômboico, ausência de seta adanal, placas ventrais pouco desenvolvidas, abertura anal ventral, ausência de setas no quarto basifêmur, solenídio em forma de clava e gnatossoma oculto pela placa anterior dorsal e, portanto, invisível desde o dorso.

Estágio 1. Os espermatídeos iniciais são células de citoplasma eletrodenso. Mitocôndrias podem ser vistas no citoplasma. O núcleo apresenta grumos de heterocromatina e é volumoso em relação ao tamanho da célula (Fig. 31 A, B).

Estágio 2. O núcleo ainda apresenta heterocromatina, apesar de a célula ser menos eletrodensa. Um complexo de Golgi bem desenvolvido é perceptível no citoplasma das células (Fig. 31 C).

Estágio 3. A célula assume um aspecto homogêneo. Praticamente nenhuma estrutura pode ser visualizada no interior da célula, sequer o núcleo pode ser facilmente separado do citoplasma (Fig. 31 C).

Estágio 4. Praticamente não há mudanças no citoplasma das células, mas a cromatina começa a se condensar junto à membrana da carioteca (Fig. 31 D, E). O complexo acrossomal já pode ser visto em uma pequena evaginação do núcleo (Fig. 31 D). Algumas vesículas anulares foram vistas no citoplasma dos espermátides nesse estágio. São possíveis mitocôndrias modificadas. A região do núcleo que contém o complexo acrossomal estende-se e constitui uma longa projeção, como um pescoço celular (Fig. 31 F). No final desse estágio surgem invaginações tubulares na membrana plasmática da célula.

Estágio 5. Os espermátides tardios apresentam o corpo de cromatina completamente condensado e destituído de carioteca. O “pescoço” celular, formado pelo complexo acrossomal e, provavelmente, microtúbulos, dobra-se sobre a célula como indicado na Fig. 32 A. Estreitas invaginações tubulares ocorrem em quase todo o restante da célula.

Espermatozóides maduros. Ainda na porção germinativa do testículo, as invaginações da membrana parecem contrair-se e serem preenchidas por material eletrodenso (Fig. 32 B). O “pescoço” celular contendo o complexo acrossomal é visto nos cortes como uma faixa ou, seccionado, em dois pontos distintos como círculos, nos dois lados do corpo de cromatina.

No lúmen os espermatozóides sofrem condensação citoplasmática e recebem uma cobertura bastante espessa de secreção (Fig 32 C). Nos dutos genitais, os espermatozóides assumem formato esférico, com as camadas de secreção surgindo com o aspecto peculiar de um conjunto de círculos concêntricos (Fig. 33 A, B).

Secreções acompanhantes. Os espermatozóides, além da cobertura individual acima referida, são acompanhados por corpúsculos de secreção de forma

irregular e outros em forma de vesículas, imersos em uma matriz de textura fina (Fig. 33 A, B). Além disso, envolvendo as gotas espermáticas no vaso deferente ou depositada na porção basal do ducto ejaculatório pôde ser vista uma secreção contendo longas plaquetas mais ou menos organizadas em fileiras (Fig. 33 A)

Gênero *Rhombognathides* Viets, 1927

Nas análises filogenéticas apresentadas por Abe (1998), os gêneros *Rhombognathides* e *Metarhombognathus* aparecem como grupos-irmãos, compartilhando, como sinapomorfias, a presença de uma seta lateral na área ocular; a ausência de setas subgenitais nas fêmeas; a presença de três pares de setas subgenitais nos machos; palpo composto por três artículos; presença de uma seta em forma de espátula no segmento distal do palpo; presença, na extremidade distal do tarso da perna III, de um espinho arredondado de cada lado e uma seta filiforme na face posterior; tarsos da perna IV com apenas um espinho em sua porção distal; e existência de apenas dois estágios ninfais. Nas mesmas análises, o monofiletismo de *Rhombognathides* foi sustentado pela posição terminal da abertura genital da fêmea e a presença de um fâmulo alongado no tarso I.

As observações foram feitas baseadas em indivíduos pertencentes a *R. seahami*.

Estágio 1. Os espermatozóides iniciais apresentam núcleos volumosos com grumos de heterocromatina (Fig. 34 A, B). No citoplasma é evidente um complexo de Golgi (Fig 34 A), cisternas de retículo endoplasmático paralelas à carioteca e mitocôndrias (Fig. 34 B).

Estágio2. A maior parte das estruturas citoplasmáticas não pode ser inequivocamente reconhecida, tampouco o núcleo, cuja cromatina parece indistinta (Fig. 34 C).

Nenhum dos cortes obtidos mostrava espermatídeos em que ficasse evidente o processo de condensação da cromatina. O estágio seguinte representa espermatídeos tardios.

Estágio 3. Os espermatídeos tardios apresentam o corpo de cromatina, completamente condensado (Fig 34 D). O complexo acrossomal é completo, com o filamento acrossomal dobrando-se abaixo do corpo de cromatina (Fig. 34 D). Mitocôndrias alongadas e destituídas de cristas são vistas próximo ao corpo de cromatina (Fig. 35 A). Numerosas invaginações tubulares estendem-se pelo citoplasma até a região nuclear. Elas parecem destituídas de preenchimento.

Digno de nota é a presença de pontes celulares conectando espermatídeos, observadas em células deste estágio (Fig. 35 A) e do seguinte (Fig. 35 B).

Espermatozóides maduros. A condensação do citoplasma obscurece as dobras da membrana plasmática dos espermatozóides que estão prontos a serem lançados no interior do lúmen do testículo ou recém recebidos neste (Fig. 35 B, D). Nos espermatozoides maduros, fica evidente a presença do filamento acrossomal dando várias voltas próximo à superfície celular (Fig. 35 D). No interior do duto ejaculatório, o espermatozóide assume o formato globular (Fig. 35 C).

Secreções acompanhantes. Acompanham os espermatozóides no duto ejaculatório secreções de aspecto eletrotranslúcido e vesicular (Fig. 35 C). Uma secreção de aspecto pouco eletrodenso e contendo plaquetas alongadas e desordenadas pode ser notada na porção basal.

Gênero *Rhombognathus* Trouessart, 1888

Abe (1998), em suas análises, obteve como sinapomorfias de *Rhombognathus* a fusão das placas ventrais, a presença de setas extra-numerárias na área equivalente às coxas II e III, e a presença de uma ou duas setas subgenitais nos machos. A espécie sobre a qual se baseou a descrição a seguir é *Rhombognathus levigatoides* Pepato & Rocha, 2007.

Estágio 1. Os espermátides iniciais (Fig. 36 A) apresentam citoplasma eletrodenso e cromatina moderadamente condensada em seus núcleos. A membrana plasmática apresenta profundas dobras. Tais dobras, que permanecem ao longo de toda a espermiogênese, são simples invaginações da membrana plasmática. No citoplasma, várias pequenas mitocôndrias, geralmente com uma única crista central, ocorrem espalhadas. Um complexo de Golgi bem desenvolvido pode ser encontrado nos estágios iniciais também (Fig. 36B).

Estágio 2. O estágio seguinte caracteriza-se pela uniformidade da cromatina. O núcleo adquire aspecto tão homogêneo que é difícil diferenciá-lo do citoplasma (Fig. 36 C).

Estágio 3. A condensação se dá de forma completamente distinta da observada nas espécies de Halacaridae descritas até agora. Ela se condensa em grumos cada vez mais espessos por todo o volume do núcleo (Fig. 37 A-B), até culminar na completa condensação da cromatina.

O filamento acrossomal aparece logo no início do processo de condensação nuclear. É interessante notar que as mitocôndrias permanecem inalteradas, com a matriz mitocondrial mais eletrodensa que o citoplasma e com ao menos uma crista.

A forma do núcleo permanece globular durante a condensação da cromatina.

Estágio 4. Ao final da espermiogênese, a membrana nuclear desaparece. Os espermátides intermediários apresentam complexo acrossomal completo, composto

pela vesícula acrossomal e grosso filamento acrossomal. Os espermatídeos tardios ocorrem na porção ventral da região germinativa do testículo, entre amplos espaços preenchidos pelo citoplasma da célula somática da região germinativa (Fig. 37 C). Eles possuem mitocôndrias convencionais, dotadas de cristas.

Espermatozóides maduros. Ao final da espermiogênese e durante o percurso no trato reprodutivo, os espermatozóides sofrem intensa condensação citoplasmática (Fig. 38 B). A vesícula acrossomal é achatada e larga, apresentando diâmetro similar ao do corpo de cromatina.

Secreções acompanhantes. Ao ser liberado no lúmen, o espermatozóide é coberto por uma cápsula de material secretado que acaba por lhe conferir um formato globular e constante. Além da secreção que o cobre, acompanha o espermatozóide glóbulos de aspecto granuloso e duas secreções de aspecto amorfo, que diferem em sua densidade ao feixe de elétrons. (Fig. 40 B) A que aparece menos densa neste caso, apresenta-se também menos corada na microscopia de luz quando empregado azul de toluidina e constitui a porção central do espermatóforo em formação no duto ejaculatório (Fig. 40 C).

Testículos. Os testículos correspondem ao plano geral observado nas demais espécies. A porção ventral apresenta células com extenso aparato de síntese e uma borda apical com microvilosidades bem desenvolvidas (Fig. 39 A, B). O lúmen possui uma morfologia lobada, desconhecida das outras espécies. É como se cada célula secretora exibisse uma reentrância na sua superfície apical (39 A).

Trato genital. O trato genital não difere especialmente das demais espécies estudadas. É digno de nota, apenas, que no vaso deferente puderam ser detectadas algumas pequenas fibras musculares (Fig. 40 B).

Subfamília Simognathinae Viets, 1927

A subfamília Simognathinae inclui apenas dois gêneros, *Simognathus* Trouessart, 1889, com 45 espécies descritas, e *Acaromantis* Trouessart & Neumann, 1893, com 11 espécies. A subfamília caracteriza-se pelo corpo fusiforme, pela inserção dorsal dos palpos, compostos por apenas dois ou três artículos e perna I modificada em uma subquela (Green & Macquitty, 1987).

A espécie que tem aqui seus espermatozóides e espermiogênese descritos é *Acaromantis vespucioi* Pepato & Tiago, 2004.

Estágio 1. Os espermátides iniciais possuem grandes núcleos, com extensa heterocromatina. O citoplasma é de aspecto eletrodenso e granuloso, com poucas mitocôndrias (Fig 41 A). Não foram observados complexos de Golgi.

Estágio 2. A heterocromatina e as mitocôndrias desapareceram (Fig 41 C, D). Núcleos e células se alongaram e a cromatina começa a se condensar junto à carioteca. Não há evidência da presença de um complexo acrossomal, que nas espécies que o possuem geralmente emerge junto com o início da condensação da cromatina.

Estágio 3. Neste estágio, a cromatina já está completamente condensada e a carioteca desapareceu. Em cortes transversais, os espermátides apresentam uma típica forma de “roda” devido a dobras da membrana plasmática (Fig 41 B-E). Complexo acrossomal ou outras organelas ausentes.

Espermatozóides maduros. A maturação do espermatozóide é completa na região ventral da porção germinativa do testículo, próximo ao lúmen. Como passo final da espermiogênese, o citoplasma passa por intensa condensação (Fig 42 B). O espermatozóide mantém o formato alongado e fusiforme dos espermátides.

Secreções acompanhantes. Cada espermatozóide é encapsulado em uma secreção produzida pelas células da porção ventral do testículo. Eles são encontrados imersos em uma massa formada por uma secreção composta por glóbulos eletrotranslúcidos e acompanhados por uma secreção amorfa semelhante àquela observada na espécie de *Rhombognathus* estudada. No vaso deferente, os espermatozóides, junto com os corpos globulares de secreção, cobertos pela secreção acima referida e outra eletrodensa (Fig. 42 A). Já mais adiante, no ducto ejaculatório, os agregados parecem se reunir em uma grande e única massa central, rodeada das secreções acompanhantes (Fig. 42 B).

Trato reprodutivo. Na porção posterior do vaso deferente e no ducto ejaculatório, foi possível encontrar numerosos processos celulares partindo da região ventral e penetrando profundamente a massa de secreções e a gota espermática (Fig. 42 C).

3.4. Discussão.

O exercício da sistemática filogenética depende da comparação de estruturas homólogas, isto é, presentes em alguma condição no ancestral comum de duas espécies. Uma das principais dificuldades da sistemática dos Halacaridae é a escassez de estruturas que preencham esse pré-requisito, ou seja, que possam ser comparados com os possíveis grupos externos, como Bdelloidea, Hydrachnidia ou Anystae e ao mesmo tempo sejam informativos para as relações filogenéticas entre as espécies pertencentes à família. Especificamente, uma rápida revisão das análises filogenéticas publicadas demonstra a utilidade da quetotaxia do dorso do idiossoma (e.g. Otto, 2000b). Em Halacaridae, as setas do dorso do idiossoma estão reduzidas tipicamente a cinco pares de setas, cuja homologia com as dos demais Prostigmata é incerta.

Isso reflete nas hipóteses encontradas na literatura quanto à posição filogenética de Halacaridae, nunca baseadas em análises filogenéticas formais.

Propomos a seguir alguns caracteres baseados na morfologia dos espermatozóides e na espermiogênese, que podem ser úteis no preenchimento dessa lacuna. Passo seguinte, seu possível significado filogenético será discutido.

1- Padrão de condensação da cromatina

Alberti & Meyer-Rochow (2002), ao descreverem a espermiogênese dos halacarídeos *Thalassarachna basteri* (Johnston, 1836) e *Halacarellus thomasi* (Newell, 1984), chamaram atenção para o padrão de condensação da cromatina nessas espécies, único entre os Prostigmata. Neles, a condensação da cromatina se dá de forma mais intensa junto à superfície interna da carioteca. Nas outras espécies de Prostigmata, a condensação da cromatina ocorre em fibras que se tornam mais e mais espessas na medida em que a condensação se processa e é uniforme através do volume do núcleo (Alberti 1980).

Alberti & Meyer-Rochow (2002) consideraram essa característica como uma possível apomorfia de Halacaridae. Exceto por se considerar as observações a respeito da espermiogênese de *Lohmannellae* e *Rhombognathides* insuficientes, acredita-se aqui que esse padrão de condensação ocorre em todos os gêneros exceto *Rhombognathus*.

2- Modificações na forma do núcleo durante a espermiogênese

Logo no início da espermiogênese, os espermatídeos parecem sofrer considerável aumento de volume, provavelmente causado pela entrada de água. Em seguida, a morfogênese do núcleo pode tomar caminhos distintos.

Em *Rhombognathus*, o núcleo permanece com formato aproximadamente globular durante toda a espermiogênese, variando em volume conforme avança a condensação da cromatina.

Em *Agauopsis*, *Copidognathus*, *Acarothrix*, *Acaromantis*, *Lohmannella* e *Arhodeoporus* o núcleo bem como toda a célula alongam-se em um processo provavelmente mediado por microtúbulos. Ainda que essa forma corresponda ao formato final da célula em *Acaromantis*, as demais espécies possuem células globulares e, em *Lohmannella*, o próprio núcleo assume formato esférico.

Em *Isobactrus*, apenas uma parte do núcleo estende-se, um traço aparentemente autapomórfico. Em *Agaue*, *Halacarus*, *Halacaropsis*, *Halacaroides*, *Thalassarachna*, *Halacarellus* e possivelmente *Rhombognathides*, o núcleo nunca assume a seção cilíndrica observada nos gêneros acima citados. Ainda que o núcleo se alongue, observa-se a concentração da cromatina na sua porção basal, que permanece pouco estendida e que acaba concentrando a cromatina. O corpo de cromatina alongado e enrolado de *Halacaropsis* deve ser considerado uma modificação desse padrão.

3- Presença e forma das mitocôndrias

Na maioria dos Prostigmata, as mitocôndrias presentes no espermatozóide apresentam cristas (Alberti & Storch, 1976; Alberti, 1980). Dentre os halacarídeos, essa condição ocorreu apenas em *Rhombognathus*.

Alberti & Meyer-Rochow (2002) consideraram as mitocôndrias ausentes em *Thalassarachna*, e chamaram atenção para as vesículas fusiformes no citoplasma que

apareceram durante a condensação da cromatina. Eles consideraram essas vesículas subprodutos da desintegração da carioteca. Exatamente as mesmas vesículas puderam ser vistas no citoplasma de espermátides avançados de *Halacarus*. A observação das espermiogêneses de mais espécies, especialmente de *Agauopsis* sp. e *Agau panopae* permitiu aqui questionar essa interpretação. Nessas espécies, é evidente que as mitocôndrias perdem suas cristas e assumem um aspecto anular ou alongado. O mesmo deve ser considerado como válido para *Halacaropsis*, *Halacaroides* e *Rhombognathides*. A condição em *Copidognathus*, *Arhodeoporus*, *Acarothrix*, *Isobactrus* e *Lohmannella* permanece incerta. Nos gêneros de Copidognathinae, *Arhodeoporus* e *Isobactrus*, mitocôndrias foram observadas nos estágios iniciais da espermiogênese; em *Copidognathus brachystomus* e *Isobactrus* há evidências de vesículas com dupla membrana, que são candidatas a serem mitocôndrias do tipo anular acima descrito.

4- Presença do complexo acrossomal

O complexo acrossomal está ausente em *Agauopsis* e *Acaromantis*. Em *Lohmannella* foi possível documentar a presença do filamento acrossomal, podendo-se supor que a vesícula acrossomal simplesmente não pôde ser documentada devido à escassez de material. Parece ausente também em *Halacarellus thomasi*, ainda que Alberti & Meyer-Rochow (2002) tenham descrito uma estrutura que vagamente lembra um complexo acrossomal nessa espécie

5- Relação do complexo acrossomal com o corpo de cromatina

A relação do núcleo (no caso corpo de cromatina, já que a carioteca foi perdida) com a vesícula acrossomal em muitas espécies de Prostigmata e Solifugae é similar àquela observada em Xiphosura, com a vesícula e material subacrossomal em contato

intímo com a cromatina. Mas em *Thalassarchna* e *Halacarus*, esse contato foi perdido e o filamento acrossomal estende-se pela metade apical da célula até penetrar no corpo de cromatina na porção basal da célula. Alberti & Meyer-Rochow (2002) notaram que isso faz com que a célula possa ser dividida em duas metades funcionalmente distintas, que como será visto mais adiante está refletido também na distribuição das especializações de membrana.

6- Posição do corpo de cromatina

Na maioria das espécies, o corpo de cromatina localiza-se no centro do espermatozóide maduro. São exceções os gêneros *Arhodeoporus*, *Copidognathus* e *Acarothrix*, que possuem o núcleo excêntrico, estendendo-se junto à membrana plasmática em um dos pólos da célula. *Thalassarachna* e *Halacarus* possuem, como mostrado aqui, o núcleo deslocado em direção à porção basal da célula.

7- Extensão do filamento acrossomal

Em Xiphosura, o filamento acrossomal se enovela na porção basal do citoplasma (Alberti & Jansen, 1986). Dentre os Halacaridae, na maioria dos casos, o filamento acrossomal, quando presente, parece se estender pouco além do limite basal do corpo de cromatina.

Em *Agaua* e *Rhombognathides* o filamento acrossomal se estende para além do corpo de cromatina e dá várias voltas junto à superfície da célula.

8- Especializações da membrana

Os Solifugae e Acariformes frequentemente apresentam especializações na membrana plasmática, sejam invaginações, sejam projeções (Alberti & Coons, 1999;

Klann *et al.*, 2009). Essas modificações parecem relacionadas ao processo de capacitação do espermatozóide, no qual projeções da célula parecem substituir o flagelo no papel de propulsor da célula em direção ao óvulo. Elas funcionariam como “reservas” de superfície celular, permitindo a rápida expansão das células e a formação de estruturas similares a pseudópodes, como observado em *Tetranychus urticae* (Mothes & Seitz, 1981).

Em *Rhombognathus*, *Agaue*, *Agauopsis*, *Halacaropsis*, *Lohmannella*, e *Rhombognathides* essas estruturas são invaginações tubulares da membrana plasmática, que aparecem vazias ao microscópio eletrônico. Em *Thalassarachna*, *Halacarellus*, *Copidognathus*, *Acarothrix*, *Arhodeoporus* e *Halacaroides* tais invaginações estão associadas a uma substância eletrodensa de natureza desconhecida. Em *Halacarellus*, dobras simples da membrana ocorrem de maneira concomitante com túbulos preenchidos de material eletrodenso.

Em *Halacarus*, foram observadas cisternas que se comunicam com o meio externo preenchidas por material eletrodenso na porção basal do espermatozóide, exatamente como em *Thalassarachna*. Se as invaginações presentes no restante da célula são preenchidas ou não, como em *Thalassarachna*, é difícil assegurar, pois as invaginações ocorrem tardiamente durante a espermiogênese, e as células apresentavam-se com o citoplasma já bastante condensado. Também é dúvida o estado de *Isobactrus* quanto a esse caráter.

Em *Acaromantis*, as dobras da membrana formam sulcos mais largos na superfície da célula, aparecendo o espermátideo tardio com aspecto similar a uma roda de carroça.

9- Secreções acompanhantes

Alberti & Meyer-Rochow (2002) chamaram atenção para os corpos de secreção de aspecto fusiformes encontrados junto aos espermatozóides em *Thalassarachna* e *Halacarellus* – seus “complex bodies”. Neste estudo, constataram-se os mesmos corpos de secreção nas espécies dos gêneros *Copidognathus*, *Acarothrix*, *Arhodeoporus* e *Halacarus*. Exceto por não se ter podido documentar os espermatozóides e secreções no interior dos vasos deferente e ducto ejaculatório de *Halacarus*, esses gêneros parecem compartilhar um conjunto de secreções semelhante ao descrito por Alberti & Meyer-Rochow (2002), incluindo uma secreção de aspecto eletrotranslúcido e estruturada, com finas plaquetas geralmente organizadas em fileiras, ocupando grande volume dos vasos deferentes e ducto ejaculatório.

Quando se observa as demais espécies, no entanto, as secreções acompanhantes tornam-se muito mais diversificadas. Em *Rhombognathus*, *Acaromantis*, *Lohmannella* e *Agauopsis*, a secreção que ocupa boa parte do volume interno do trato genital não apresenta a estrutura em plaquetas acima referida. Pelo contrário, é completamente amorfa. As referidas plaquetas são presentes, no entanto em *Isobactrus*, *Agauae*, *Halacaroides*, *Rhombognathides* e, possivelmente, em *Halacaropsis*.

Quanto aos corpúsculos de secreção observados, percebe-se que podem ser homogêneos, como em *Rhombognathus*, *Acaromantis*, *Halacaropsis*, nos quais apenas um tipo de glóbulo foi detectado, ainda que diferentes de uma espécie para outra. Já as espécies de *Copidognathus*, *Arhodeoporus*, *Acarothrix*, *Agauopsis*, *Rhombognathides*, *Halacaroides*, *Thalassarachna*, *Halacarellus*, *Lohmannella*, *Halacarus* e *Isobactrus* tem-se ao menos dois tipos de secreção diferentes. É interessante notar que ao menos em *Copidognathus*, *Arhodeoporus*, *Acarothrix*, *Agauopsis*, *Halacaroides* e *Halacarellus* a distribuição de um dos tipos de corpúsculo não se dá ao acaso, ocorrendo em associação mais estreita com os espermatozóides.

Glóbulos de aspecto vesicular (isto é, com a periferia eletrodensa e o centro eletrotranslúcido) estão presentes em *Agaue*, *Halacaropsis*, *Rhombognathides* e, em pequena quantidade, em *Isobactrus*.

Ainda que não seja clara a homologia dessas diferentes secreções, seria pertinente verificar a sua composição química. A julgar por outros grupos, elas devem cumprir papel importante na manutenção da viabilidade dos espermatozóides após a deposição do espermatóforo, como observado por Witte (1991) para os Parasintegona terrestres.

10- Agregados de espermatozóides

Alberti & Meyer-Rochow (2002) deram ênfase à ocorrência de agregados de espermatozóides em *Halacarellus thomasi*. O que se notou aqui ao serem observados cortes em várias alturas do trato genital é que tais agregados podem estar presentes nas porções anteriores do vaso deferente e os espermatozóides estarem todos reunidos em uma única grande gota espermática dentro do ducto ejaculatório.

A única espécie em que agregados espermáticos devem estar presentes de fato no espermatóforo é *Halacaropsis hirsuta*.

11- Inclusões citoplasmáticas

Em duas espécies, inclusões citoplasmáticas foram encontradas de maneira regular durante a espermiogênese. Em *Halacaroides* sp. nov., consistiam de uma massa transitória de grânulos eletrodensos no citoplasma dos espermátides tardios. Eles desaparecem no final da espermiogênese. Em *Agaue panopae* é uma inclusão única, sempre ao lado da vesícula acrossomal e que permanece no espermatozóide maduro. Não é possível sugerir a função dessas inclusões.

3.4.1 Táxons sugeridos pela estrutura dos espermatozóides

Não se pretende aqui promover determinados táxons através dos dados obtidos da espermiogênese e morfologia dos espermatozóides apenas. Isso não substitui uma análise filogenética que inclua um corpo de evidência mais amplo.

Por outro lado, a simples observação dos caracteres diagnósticos revela que as subfamílias e gêneros de Halacaridae não são definidos por sinapomorfias. Muitos dos caracteres empregados não permitem comparação com o grupo externo, ou são polimórficos neste último. Assim, mesmo poucos caracteres definidos com clareza e codificáveis para o grupo externo podem ter um grande impacto na compreensão da história evolutiva da família.

Posição filogenética dos Halacaridae

Schwoerbel (1986) propôs Hydrovolziidae como grupo-irmão de Halacaridae. Sua suposição, no entanto, foi baseada em informações errôneas quanto à morfologia e desenvolvimento desses ácaros, como a existência de larvas de vida livre ou a inexistência de acetábulos genitais externos em Hydrovolziidae. A inclusão desse táxon entre os Hydrachnidia (como em Panesar, 2004) corresponde melhor ao conhecimento atual a respeito do grupo.

Além disso, a posição de Hydrovolziidae entre os Hydrachnidia está de acordo com ao menos duas apomorfias derivadas da observação da morfologia dos espermatozóides, ambas ausentes em todas as espécies de Halacaridae analisadas: a presença de um complexo acrossomal restrito à vesícula acrossomal e a existência de um campo com grânulos, possivelmente glicogênio, nos espermatozóides maduros.

A morfologia dos espermatozóides não fornece suporte ao monofiletismo de Halacaridae ou a algum grupo de Prostigmata como seu grupo-irmão. Como se vê a seguir, isso se deve à morfologia plesiotípica dos espermatozóides no gênero *Rhombognathus*.

Monofiletismo de Rhombognathinae

Abé (1998), ao inferir a filogenia de Rhombognathinae, encontrou apenas duas apomorfias em suporte da subfamília: a coloração verde escura e a presença de duas fileiras de apódemas filamentosos na placa faringeal. Porém a coloração observada nesses ácaros é produto do conteúdo intestinal, e os dois caracteres podem ser relacionados à dieta dos grupo, não sendo independentes. Bartsch (2003b) questionou ambos e o próprio monofiletismo da subfamília.

O gênero *Rhombognathus* apresenta duas características bastante distintas de todas as demais espécies estudadas: o padrão de condensação da cromatina e a manutenção no espermatozóide maduro de cristas nas mitocôndrias.

Esses caracteres possuem a vantagem, sobre a maioria dos caracteres empregados por Abe (1998), de serem acessíveis à comparação com várias espécies de Prostigmata. Assim, se empregarmos táxons como Bdellidae, Parasintegona e Anystae como grupo externo, tem-se esses dois estados de caráter observados em *Rhombognathus* como plesiomorfias em relação às outras espécies da família. A consequência é que os dados espermatológicos suportam Rhombognathinae ao menos parafilética em relação aos demais Halacaridae.

O gênero *Isobactrus* apresenta uma série de características espermatológicas melhor consideradas como autapomórficas, como a extensão da região do complexo acrossomal. O padrão de condensação da cromatina, que é centrípeto, é uma apomorfia

que favorece seu agrupamento, com os demais Halacaridae em um clado que exclui *Rhombognathus*.

Mas é o gênero *Rhombognathides*, no entanto, que mais claramente exhibe apomorfias que o une a gêneros fora de Rhombognathinae. A morfologia específica da mitocôndria, destituída de cristas e alongada, é compartilhada com *Agaue*, *Halacaroides*, *Halacaropsis* e *Halacarus*. Já as numerosas voltas do filamento acrossomal são compartilhadas com *Agaue* apenas.

Bartsch (2003b) já havia questionado o monofiletismo da subfamília. As observações aqui apresentadas suportam seus argumentos e sugerem que a ficofagia evoluiu de maneira independente ao menos duas vezes em Halacaridae.

***Arhodeoporus* e Copidognathinae**

O gênero *Arhodeoporus*, como mencionado acima, compartilha a maior parte dos caracteres diagnósticos com a subfamília Copidognathinae. A ausência de caracteres que possam ser apontados como sinapomorfias, como a supressão do estágio de deutoninfa, levou a que o gênero fosse mantido em Halacarinae.

A espermiogênese e morfologia dos espermatozoides nas espécies de *Arhodeoporus* e Copidognathinae são indistinguíveis. Elas incluem traços claramente apomórficos, como a posição final do núcleo excêntrica e paralela à superfície da célula e o complexo acrossomal, que inclui uma vesícula acrossomal mais estreita que o diâmetro do núcleo.

O alcance dessa descoberta é considerável para a sistemática da família, visto que Copidognathinae inclui mais de um terço de todas as espécies de Halacaridae descritas (Bartsch, 2009). É sugerido aqui que *Arhodeoporus* pode se prestar a um grupo externo adequado em futuros estudos a respeito dessa subfamília.

Note-se que com isso a subfamília Halacarinae, como normalmente delimitada, não é suportada como um táxon monofilético pelas informações fornecidas pelos espermatozóides.

Halacarus e Thalassarachna

O nome *Thalassarachna* já foi empregado em paralelo a *Halacarellus* até a rediagnose dos dois gêneros por Bartsch (1997). Os dados da morfologia dos espermatozóides obtidos até agora suportam essa separação. Mais que isso, no curso do presente estudo uma série de possíveis apomorfias puderam ser detectadas ligando *Halacarus* a *Thalassarachna*: as espécies dos dois gêneros apresentam prováveis mitocôndrias com aparência fusiforme, destituídas de cristas; durante a espermiogênese, o núcleo se separa da vesícula acrossomal e o filamento acrossomal percorre livre o citoplasma entre a vesícula acrossomal e o corpo de cromatina, que encontra-se na metade basal da célula; e cisternas eletrodensas com comunicação com o meio externo através de poros laterais emergem na fase final da espermiogênese.

3.5. Referências

- Abe, H. 1998. *Rhombognathine Mites: Taxonomy, Phylogeny, and Biogeography*. Hokkaido University Press, Sapporo, 228pp.
- Alberti, G. 1980. Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiocyto-genese der Milben (Acari). II. Actinotrichida. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 104, 144-203.
- Alberti, G. 1991. Spermatology in the Acari: systematic and functional implications. In: Schuster, R., Murphy, P. W. *The Acari: Reproduction, Development and Life-History Strategies*. Chapman and Hall, London, 77-105.

- Alberti, G. & Coons, L. B. 1999. Acari-Mites. In: Harrison, F. W. *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol 8c. John Wiley & Sons, Inc., New York, 515-1265.
- Alberti, G., and Janssen, H.-H. 1986. On the fine structure of spermatozoa of *Tachypleus gigas* (Xiphosura, Merostomata). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 9, 309–319.
- Alberti, G. & Meyer-Rochow, V. B. 2002. Ultrastructural investigations of testes and spermiogenesis in two species of halacarid mites (Halacaridae, Actinedida, Actinotrichida): *Thalassarachna basteri* from the Baltic Sea and *Halacarellus thomasi* McMurdo Sound (Antarctica). *Arthropod Structure and Development*, 30, 315-328.
- Bacceti, B., 1979. Ultrastructure of sperm and its bearing on arthropod phylogeny. In: Gupta, A. P. *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 609-644.
- Baccetti, B. & Afzelius, A., 1976. The Biology of the Sperm Cell. S. Karger, Basel/Munchen/Paris/London/New York/Sydney, VI + 254 p
- Bartsch, I., 1983. Vorschlag zur Neugliederung des Systems der Halacaridae (Acari). *Zoologische Jahrbuecher Abteilung für Systematik Oekologie und Geographie der Tiere*, 110, 179-200.
- Bartsch, I., 1990. *Acarothrix palustris* gen. et spec. nov. (Halacaroida, Acari), ein Bewohner der Salzwiesen Südchinas. *Zoologischer Anzeiger*, 224, 204-210.
- Bartsch, I., 1992. *Phacacarus flavellus* gen. et spec. nov. (Copidognathinae, Halacaroida, Acari), eine Meeresmilbe auf Kalkalgen. *Zoologischer Anzeiger*, 228, 212-219

- Bartsch, I., 1996. Halacarines (Acari: Halacaridae) from Rottnest Island, Western Australia: the genera *Agauopsis* Viets and *Halacaropsis* gen. nov. *Records of the Western Australian Museum*, 18, 1–18.
- Bartsch, I., 1997 *Thalassarachna* and *Halacarellus* (Halacaridae: Acari): two separate genera. *Journal of Natural History*, 31, 1223–1236.
- Bartsch, I., 1999. Freshwater *Copidognathus* (Halacaridae, Acari) in Europe: A re-evaluation. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 96, 169-179.
- Bartsch, I., 2003a. A new species of the *brevipalpus* group, genus *Agauopsis* (Halacaridae: Acari) from Dampier, Western Australia: description and key to related species. In: Wells, F. E., Walker, D. I., Kirkman, H. & Lethbridge, R. *The Marine Flora and Fauna of Dampier, Western Australia*, Western Australian Museum, Perth, 241-254.
- Bartsch, I., 2003b. The subfamily Rhombognathinae: Developmental pattern and re-evaluation of the phylogeny (Arachnida, Acari, Halacaridae). *Senckenbergiana Biologica*, 82, 15-57.
- Bartsch, I., 2006. Halacaroida (Acari): a guide to marine genera. *Organisms, Diversity and Evolution*, Electronic Supplement, 6, 1-104.
- Bartsch, I., 2009. Checklist of marine and freshwater halacarid mite genera and species (Halacaridae: Acari) with notes on synonyms, habitats, distribution and descriptions of the taxa. *Zootaxa*, 1998, 1-170.
- Callaini, G. & Dallai, R. 1993. The spermatozoon of Pseudoscorpions (Arachnida). *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali*, 26, 35-52.
- Evans, G. O. 1992. *Principles of Acarology*, CAB International, Wallingford, xviii + 563 pp.

- Green J. & Macquitty M. 1987. *Halacarid mites*. Linnean Society of London/Estuarine and Brackish-Water Sciences Association & E.J. Brill/W, Backhuys, London, 178 pp.
- Harvey, M. S. 1990. Pezidae, a new freshwater mite family from Australia (Acarina: Halacaroida). *Invertebrate Taxonomy*, 3, 771-778.
- Kirchner, W. P. 1967. Spermatophoren bei Halacariden (Acari). *Naturwissenschaften*, 54, 345-346.
- Mothes, U & Seitz, K. 1981. The transformation of male sex cells of *Tetranychus urticae* K. (Acari, Tetranychidae) during passage from the testis to the oocytes: an electron microscopy study. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 4, 81-94.
- Newell, I. M. 1984. Biology of the Antarctic Seas. XV Antarctic Halacaroida. - *Antarctic Research Series*, 40, 1-284.
- Otto, J.C. 2000a. *Xenohalacarus longirostris* n.gen., n.sp., a marine mite (Acari: Halacaridae: Lohmannellinae) from Chilcott Islet, Australia. *International Journal of Acarology*, 26, 285-291.
- Otto, J. C. 2000b. A cladistic analysis of Erythracarinae (Acarina: Prostigmata: Anystidae), with the description of a new genus. *Systematic entomology*, 25, 447-484.
- Pahnke, A. 1974. Zur Biologie, Ökologie und Anatomie einheimischer Halacaridae (Acari). Tese de doutorado, Fakultät der Cristian Albrechts Universität, Kiel, 117pp.
- Panesar, A. R. 2004. A revision of the Anisitsiellidae. *Bonner Zoologische Monographien*, 52, i + 1-144.

- Pepato, A. R., Santos, C. & Tiago, C. G. 2005. Two new closely related species of *Copidognathus* (Acari, Halacaridae) associated with crabs. *Cahiers de Biologie Marine*, 46, 69-79.
- Shin, J. H., Mahadevan, L., Waller, G. S., Langsetmo, K. & Matsudaira, P. 2003. Stored elastic energy powers the 60- μ m extension of the *Limulus polyphemus* sperm actin bundle. *The Journal of Cell Biology*, 162, 1183–1188.
- Thomae, H., 1991. Beiträge zur Anatomie der Halacariden. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 47, 155-190.
- Vacquier, V. D. 1998. Evolution of Gamete Recognition Proteins. *Science*. 281:1995-1998.
- van Deurs, B. 1974a. Pycnogonid sperm. An example of inter- and intraspecific axonemal variation. *Cell Tissue Research*, 149, 105–111.
- van Deurs, B. 1974b. Spermatology of some Pycnogonida with special reference to a microtubule-nuclear envelope complex. *Acta Zool. (Stockholm)*, 55, 151–162.
- Witte, H. 1975. Funktionsanatomie der Genitalorgane und Fortpflanzungsverhalten bei den Männchen der Erythraeidae (Acari, Trombidiformes). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 80, 137-180.
- Witte, H., 1991. Indirect sperm transfer in prostigmatic mites from a phylogenetic viewpoint. In: Schuster, R., Murphy, P. W. *The Acari: Reproduction, Development and Life-history Strategies*. Chapman & Hall, London, 137-176.

3.6 Figuras

Figura 1. *Copidognathus floridensis*, Micrografia de um corte ultrafino através de um dos testículos. Nota-se claramente a divisão entre a porção germinativa e secretora do testículo. ES, esqueleto ejacutório; GA, placa genitoanal; Lu, Lúmen; mu, músculos extrínsecos das pernas III e IV; PD, placa posterior dorsal; PE, placa epimeral posterior; T(Ge), porção germinativa do testículo; T(GI), porção secretora do testículo; VD, Vaso defrente. Barra de escala: 10 μ m.

Figura 2. *Copidognathus floridensis*, dois primeiros estágios da espermiogênese. A- 1- Primeiro estágio. 2- segundo estágio. As pontas de flecha indicam processos celulares que preenchem os espaços entre os espermatídeos. Ci, citoplasma da célula somática onde estão embebidos os espermatídeos. B- Espermatídeo inicial. C- Detalhe da foto anterior mostrando o complexo de Golgi (G), notar também o grande número de polirribossomos. Barras de escala: A,B, 1 μ m; C, 0,5 μ m.

Figura 3. *Copidognathus floridensis*. A- Estágio 3. Note as pequenas invaginações preenchidas com matéria eletrodensa na periferia das células deste estágio. B- Complexo acrossomal, VA, vesícula acrossomal. C- Detalhe da periferia de um espermatídeo intermediário, as pontas de flecha indicam a abertura dos túbulos. D- Espermatídeos avançados. E- Núcleo de espermatídeo intermediário; notar os microtúbulos. Barras de escala: A e D, 1 μm ; B, C e E, 0,5 μm .

Figura 4. *Copidognathus floridensis*. A- Lúmen do testículo. Na porção superior da foto, a área germinativa com numerosos espermatídeos avançados e espermatozóides embebidos no citoplasma de célula somática cujo citoplasma apresenta algumas mitocôndrias (M). A porção secretora, na porção inferior da foto, possui retículo endoplasmático rugoso abundante e microvilosidades na sua borda apical (MV). B- Aspecto de secreção que acompanha a massa de espermatozóides, notar as estruturas “empilhadas”. C- Espermatozóides maduros, com o corpo de cromatina excêntrico, note as secreções mais densas e fusiformes ou elípticas espalhadas na massa espermática (*), e corpos eletrotranslúcidos junto aos espermatozóides. Barras de escala: A e C, 1 μm ; B, 0,5 μm .

Figura 5. *Copidognathus floridensis* A- Vaso deferente (VD), abaixo da placa dorsal posterior (PD). B- Epitélio do Vaso Deferente; N, núcleo do epitélio do vaso deferente. Barras de Escala: A, 5 μm ; B, 1 μm .

Figura 6. *Copidognathus brachystomus* A- Espermátídeos iniciais, G, complexo de Golgi. B- Detalhe de dois espermátídeos avançados vizinhos. Vê-se o complexo acrossomal em um deles e no outro, vesículas achatadas em íntimo contato com a membrana plasmática (flechas), VA, Vesícula acrossomal. C- Espermátídeos, estágio 3. Notam-se as vesículas alongadas em forma de halteres (flechas) D- Espermátídeos, estágio 5. E- Espermátídeos estágio 4. Barras de Escala: A e E, 2 μ m; B, 0,5 μ m; C - D, 1 μ m.

Figura 7. *Copidognathus brachystomus*. A- Vaso deferente, OD, órgão dorsal. B- Secreção com estruturas em pilha. C- Espermatozóide no lúmen do testículo, (*, complexos de Golgi) D- Espermatozóides no vaso deferente. Barras de escala: A, 5 μ m; B, 0,5 μ m; C, 1 μ m; D, 2 μ m.

Figura 8. *Copidognathus tupinamborum* A- Detalhe do espermatídeo intermediário, o complexo acrossomal completo com a vesícula acrossomal (VA) e o filamento acrossomal (FA); a ponta de flecha indica a abertura de um dos túbulos eletrodensos que cruzam o citoplasma. B- Espermatídeos intermediários entre os quais podem ser observados processos celulares (PC). C- Espermatídeos iniciais. D- Espermatídeos do estágio 2. Notar o citoplasma eletrotranslúcido e o volume aumentado da célula. Barras de escala: A, 0,5 μm ; B - D, 2 μm .

Figura 9. *Copidognathus tupinamborum* A- Espermatozoides no interior do Vaso deferente, OD, órgão dorsal. B- Célula da região secretora do testículo, Nu, nucléolo, Lu, lúmen. C- Secreção em pilha. Barras de escala: A, 1 μm ; B, 2 μm ; C, 0,5 μm .

Figura 10. *Copidognathus* sp. A- Porção ventral do ducto ejaculatório. Notam-se os processos celulares dentro da massa de esperma (pontas de flecha); N, núcleo do epitélio da porção basal do ducto ejaculatório. B- Espermatídeos avançados. C- Espermatozóides maduros. D- Espermatídeos iniciais. Barras de escala: A - C, 1 μ m; D, 2 μ m.

Figura 11 *Acarothrix* sp. A- Detalhe de uma célula secretora do testículo, (N) núcleo, (G) complexo de Golgi. B- Espermatozóide no interior do lúmen do testículo, o corpo de cromatina (C) possui posição excêntrica na célula. C- Lúmen do testículo (Lu), note os espermatozóides na porção germinativa (T(G)) do testículo e no interior do lúmen (*). D- Detalhe da massa de secreção que acompanha a gota de espermatozóides no vaso deferente. E- Espermatozóides no interior do vaso deferente; C, corpo de cromatina. Barras de escala: A, B e D; 1 µm; C, 5 µm; E, 2 µm.

Figura 12. *Agauopsis* sp. A- Espermatídeo inicial. B- Detalhe do citoplasma do espermatídeo inicial. Notam-se mitocôndrias e numerosos polirribossomos espalhados no interior do citoplasma. C- Detalhe do citoplasma do segundo estágio; ainda que com crista, as mitocôndrias estão mais condensadas e concentram-se junto à membrana plasmática. D- Segundo estágio. Barras de escala: A e D, 1 µm; B - C, 0,5 µm.

Figura 13 *Agauopsis* sp. A- Espermatídeo intermediário. Notar, as extensas invaginações da membrana plasmática, as mitocôndrias na porção cortical da célula e o núcleo com a cromatina em processo de condensação. B- Corte quase longitudinal através do núcleo (N) em condensação de um espermatídeo intermediário. C- Periferia do citoplasma do espermatídeo intermediário. Notar o aspecto anular das mitocôndrias. D- Espermatídeo tardio, C, corpo de cromatina. Barras de escala: A, B e D, 1 μ m; C, 0,25 μ m.

Figura 14 *Agauopsis* sp. A- Espermatozóides maduros no interior do vaso deferente. B- Detalhe do citoplasma de uma célula da área secretora do testículo. C- Espermatozóide maduro no interior do lúmen do testículo antes de completar a condensação do citoplasma; MV, microvilosidades das células secretoras. Barras de escala: A e B, 1 μ m; B, 0,5 μ m.

Figura 15 *Arhodeoporus gracilipes*. A- Espermatídeos iniciais. Observem o elevado número de mitocôndrias (M), e a presença de heterocromatina nos núcleos (N). B- Espermatídeos intermediários. Nota-se no interior do núcleo a presença do filamento acrossomal (setas). C- Espermatídeos mostrando a condensação da cromatina, mais intensa junto à membrana nuclear. D- Espermatídeo tardio, mostrando o complexo acrosomal; VA, vesícula acrossomal. E- Espermatídeos tardios. Barras de escala: A, B e C, 2 μ m; D e E, 1 μ m.

Figura 16 *Arhodeoporus gracilipes*. A- Aspecto do esperma no interior do vaso deferente. Note os espermatozoides na porção dorsal. B- Espermatozoides maduros no ducto ejaculatório. Notar a posição excêntrica do núcleo e a região cortical convoluta. C- Lúmen (Lu.) do testículo, mostrando a região germinativa dorsal e a ventral secretora com microvilosidades; Ne. Fibra nervosa. Barras de escala: A e B, 5 μm ; C, 1 μm .

Figura 17. *Halacaroides* sp. nov. A- Seção transversal através da área genital de um macho. Notar as duas regiões do testículo: T(G) região germinativa dorsal do testículo, contendo os espermatídeos, e T(S), a região ventral e secretora. Espermatozoides (Esp.) são encontrados sobre um centro de secreção, dentro do ducto ejaculatório (DE), logo abaixo do órgão dorsal (OD). A flecha indica o lúmen do testículo, EE, esqueleto genital. B- Porção secretora do testículo. Barras de escala: A, 5 μ m; B, 1 μ m.

Figura 18: *Halacaroides* sp. nov.: A- Espermatídeos intermediários. Note as mitocôndrias (pontas de seta) e grânulos eletrodensos (G). B- Espermatídeo tardio. Notar o complexo acrossomal com uma vesícula acrossomal (AV), e um filamento acrossomal (AF). O espermatozóide apresenta ainda tubulos eletrodensos cruzando o citoplasma. C- Espermatídeos iniciais. D- Espermatozóides maduros sendo depositados no lúmen. MV, microvilosidades das células secretoras. E- Espermatídeos intermediários. Percebe-se o padrão periférico de condensação da cromatina. Barras de escala: A - D, 0,5 μm ; E, 1 μm .

Figura 19: *Halacaroides* sp. nov.: A- Espermatozóides. Notar o fino epitélio do vaso deferente; OD, órgão dorsal; N, Núcleo do epitélio do duto ejaculatório. B- Espermatozóide (VA), vesícula acrossomal. C- Espermatozóide com densas inclusões na camada de secreção que o recobre. D- Aspecto da secreção sobre a qual são depositados os espermatozóides no espermatóforo em formação. Barras de escala: A, 1 μ m; B - D, 0.5 μ m.

Figura 20: *Halacaropsis hirsuta*. A- Espermatídeos iniciais. B- Espermatídeos intermediários, com a cromatina concentrada em um dos pólos da célula. C- Espermatídeo intermediário, com mitocôndrias anulares (M) próximas ao núcleo e a vesícula acrossomal (VA) em formação. D- Espermatozóides dentro do lúmen do testículo. Note as mitocôndrias em torno do núcleo (indicadas por *). Barras de escala: A, 2 μm ; B, 5 μm ; C - D, 1 μm .

Figura 21: *Halacaropsis hirsuta*. A- Agregados espermáticos no interior do ducto ejaculatório, notar que estão imersos em uma secreção que contém corpos similares a vesículas. B- Agregado espermático. Notar que, em alguns espermatozoides, os corpos de cromatina são atravessados várias vezes pelos cortes, o que indica que o núcleo alongado se dobra várias vezes. C- Detalhe de um espermatozoide mostrando a vesícula acrossomal (VA). Notar as mitocôndrias junto ao corpo de cromatina (indicadas por *). D- Espermatozoide. Notar o corpo de cromatina cortado em vários pontos e as mitocôndrias a ele associadas (*). Barras de escala: A, 5 μm ; B, 2 μm ; C - D, 1 μm .

Figura 22: *Halacaropsis hirsuta*. A- Lúmen (Lu.) e células secretoras, contendo um núcleo (N). Notar a presença de grânulos maiores e moderadamente eletrodensos (*) e de outros menores e eletrodensos (pontas de flecha); Ne., fibra nervosa. B- Detalhe da mesma célula mostrando um complexo de Golgi (G) e mitocôndria (M) próxima ao núcleo (N). Barras de escala: A, 2 μm ; B, 1 μm .

Figura 23: *Halacarus actenos*. A- Espermatídeo inicial, (as pequenas vesículas indicadas pelas cabeças-de-seta e são provavelmente mitocôndrias). B- Estágio 2 da espermiogênese. C- Espermatídeo intermediário (notar o contorno irregular da célula); VA, Vesícula acrossomal; Se, região secretora. D- Espermatídeos em processo de condensação da cromatina; VA, Vesícula acrossomal. Barras de escala: A, C, D, 1 μ m; B, 2 μ m.

Figura 24: *Halacarus actenos*. A- Estágio 5 da espermiogênese. B- Estágio 6 da espermiogênese, com vesículas fusiformes indicadas por (*), possíveis mitocôndrias; AV, vesícula acrossomal. C- Espermatozóide; notar as vesículas fusiformes (*), e o filamento acrossomal seccionado três vezes (pontas de flechas); AV, vesícula acrossomal. D- Lúmen do testículo (Lu.); *, espermatozóides. E- Espermatozóides. Notar as invaginações preenchidas por material eletrodenso (setas). Barras de escala: A - C, E, 1 μ m; D, 2 μ m.

Figura 25: *Agaue panopae*. A- Espermatídeos iniciais. Notar a presença de processos celulares entre as células (ponta-de seta). B- Estágio 2 da espermiogênese. C- Estágio 3. Notar a granulação densa em torno do núcleo e a vesícula acrossomal (VA). D- Estágio 4; notar as mitocôndrias alongadas próximas aos núcleos (N) dos espermatídeos. Barras de escala: A, C, D, 1 μ m; B, 2 μ m.

Figura 26: *Agaue panopae*: A- Estágio 5 da espermiogênese; notar a ponte celular ligando espermatídeos (seta) e interdigitações entre espermatídeos contíguos (ponta de seta). B- Mesmo estágio em corte aproximadamente transversal; VA vesícula acrossomal. C- Estágio 5, em corte aproximadamente longitudinal; com a inclusão eletrodensa junto ao complexo acrossomal (I) e as mitocôndrias alongadas (M); VA, vesícula acrossomal. D- Espermatozoides no lúmen do testículo; (Ci.) citoplasma da célula somática da região germinativa. E- Espermatozóide; notar que o filamento acrossomal é seccionado várias vezes próximo à superfície da célula (pontas-de-flechas). Barras de escala: A, D, 2 μ m; B, C, E, 1 μ m.

Figura 27: *Agaue panopae*: A- Vaso deferente (VD). Notar os processos celulares que partem de sua porção basal, alguns dos quais indicados por pontas de seta; OD, órgão dorsal. B- Detalhe do epitélio do vaso deferente, mostrando microvilosidades (pontas de setas). C- Espermatozóide. Barras de escala: A, 5 μm ; B e C, 1 μm .

Figura 28 *Lohmannella rectangulops* A- Dois primeiros estágios da espermiogênese. B- Célula do segundo estágio aparentemente iniciando seu alongamento. C- Espermatídeo intermediário, notar o filamento acrossomal seccionado duas vezes (setas). D- Espermatídeo intermediário em que a condensação da cromatina está mais avançada. Notar que não há um padrão centrípeto de condensação evidente. Barras de escala: A-D, 1 μ m.

Figura 29 *Lohmannella rectangulops* A - Espermatozóides no interior do vaso deferente. B- Espermatídeos tardios. Percebe-se a grande densidade das invaginações da membrana plasmática. Barras de escala: 1 μ m.

Figura 30 *Lohmannella rectangulops*. Lúmen do testículo; N, núcleo de célula da área secretora; MV, microvilosidades. Barra de escala: 5 μ m.

Figura 31 *Isobacterus unicustatus*: A- Grupo de espermatídeos no estágio 1. B- Mesmo estágio, com a presença de mitocôndrias (pontas de seta). C- Estágio 2 e 3, as primeiras com complexos de Golgi (G). D- Estágio 4, com a presença de pequenas vesículas anulares (possíveis mitocôndrias) (ponta de flecha), e do complexo acrossomal já desenvolvido; AV, vesícula acrossomal. E- Estágio 4, as setas indicam o filamento acrossomal. F- Estágio 4, notar o corte quase longitudinal do “pescoço” associado ao complexo acrossomal; as setas indicam o filamento acrossomal; AV, vesícula acrossomal. Barras de escala: A - C, E, F, 1 μ m; D, 2 μ m.

Figura 32 *Isobactrus unicustatus*. A- Espermátídeos no estágio 5, note que o “pescoço” agora se encontra dobrado; AV, vesícula acrossomal. B- Espermatozóides antes de serem liberados no lúmen do testículo; AV, vesícula acrossomal. C- Lúmen do testículo (Lu.). Barras de escala: A, B, 1 μ m; C, 2 μ m.

Figura 33 *Isobactrus unicustatus*. A- Espermatozóides no interior do vaso deferente. Notar a secreção com fileiras de plaquetas alongadas contendo a gota de esperma. B- Espermatozóides no ducto ejaculatório. As pontas de seta indicam os pontos em que o “pescoço” celular associado ao complexo acrossomal foi seccionado. Barras de escala: A, 2 μm ; B, 1 μm .

Figura 34 *Rhombognathides seahami*. A- Espermatídeos iniciais; G, complexo de Golgi. B- Espermatídeo inicial. As pontas de seta indicam mitocôndrias no citoplasma do espermatídeo; M, mitocôndria no citoplasma da célula somática que envolve os espermatídeos. C- Estágio 2 da espermiogênese. D- Espermatídeo tardio. As pontas de seta indicam porções do filamento acrossomal; VA-, vesícula acrossomal; G, complexo de Golgi; M, mitocôndria no citoplasma da célula somática que envolve os espermatídeos. Barras de escala: A, 2 μm ; B, C, 1 μm ; D, 0,5 μm .

Figura 35 *Rhombognathides seahami*. A- Espermatídeos tardios. Notar processos celulares (PC) ligando dois espermatídeos, e as mitocôndrias destituídas de cristas (pontas de seta) junto ao corpo de cromatina. B- Estágio final da espermiogênese, com processos celulares (PC). C- Espermatozóide no interior do ducto ejaculatório. As pontas de seta indicam mitocôndrias. D- Lúmen do testículo; *, indica um espermatozóide em que o filamento é interceptado várias vezes. Barras de escala: A - C, 2 μ m; D, 1 μ m.

Figura 36. *Rhombognathus levigatoides*. A- Primeiro estágio, com citoplasma denso, rico em polirribossomos. B- Citoplasma do segundo espermatídeo; pode-se ver uma mitocôndria (flecha) com uma única crista e complexo de Golgi (G); C- Segundo espermatídeo. Barras de Escala: A e C: 1 μm ; B, 0,5 μm .

Figura 37. *Rhombognathus levigatoides*. A- Espermatídeos intermediários. Notar as dobras da membrana plasmática; B- Espermatídeos com a cromatina quase completamente condensada. M, indica uma mitocôndria da célula somática da região germinativa, vesícula acrossomal (VA) e o grosso filamento acrossomal (FA); a ponta-de-seta indica uma mitocôndria. C- Espermatozóides maduros dentro do citoplasma da célula somática da região germinativa; Barra de escala: A-C, 1 μ m.

Figura 38. *Rhombognathus levigatoides*. A- Espermatozóide maduro, FA, filamento acrossomal, VA, vesícula acrossomal. B- Aspecto do citoplasma do espermatozóide maduro. Barras de escala: 0.5 µm.

Figura 39. *Rhombognathus levigatoides*. A- Espermatozóides são entregues ao lúmen do testículo (Lu.), aí são cobertos por material secretado pela porção glandular do testículo. Notar as microvilosidades das células secretoras. B- Detalhe do citoplasma de uma célula da porção secretora do testículo. Notar o aparato de síntese protéica bem desenvolvido, N, núcleo. Barra de escala: A-B, 1 μ m.

Figura 40. *Rhombognathus levigatoides*. A- Vaso deferente, OD, órgão dorsal; B- Duto ejaculatório, com fibras musculares associadas à parede do tubo (flechas). Notar a secreção amorfa à esquerda da figura; N, núcleo do epitélio do vaso deferente; C- Micrografia de luz. Notar o aspecto do espermatóforo em formação, constituído por um centro sobre o qual são depositados os espermatozóides. Barras de escala: A, 2 μm ; B, 1 μm ; C, 25 μm .

Figure 41: *Acaromantis vespucioi* A- Espermatídeos iniciais, apresentando heterocromatina e mitocôndria (seta). B- Detalhe de um espermatídeo final. Notar as dobras profundas da membrana plasmática e redução do citoplasma. C- Espermatídeo intermediário; a cromatina condensa-se centrípetamente. D- Seção transversal de espermatídeos um pouco mais adiantados; novamente, a cromatina aparece mais condensada junto à carioteca. E- Espermatídeos finais. Barras de escala: A, C – E, 1 μm ; B, 0,5 μm .

Figura 42: *Acaromantis vespucioi*. A- Agregados de espermatozoides dentro do vaso deferente. B- Espermatozoides maduros; núcleo e citoplasma intensamente condensados. C- Massa de espermatozoides coberta pelas mesmas secreções, provavelmente resultado da fusão dos agregados de espermatozoides. Barras de escala: A e C, 2 μm ; B, 1 μm .

Capítulo 4. Uma nova espécie de *Halacaroides* do litoral norte de São Paulo

---

Abstract

The genus *Halacaroides* is recorded from the Brazilian coastline for the first time. Brazilian specimens differ from previously described *Halacaroides* by their slender gnathosoma, presence of two external genital acetabula in males, three pairs of subgenital setae in males and none in females.

Resumo

A primeira ocorrência do gênero *Halacaroides* é registrada para a costa brasileira. Os espécimes diferem das espécies anteriormente descritas pelo gnatossoma alongado, presença de dois acetábulos genitais externos nos machos, três pares de setas subgenitais nos machos e nenhum nas fêmeas.

4.1. Introdução

A família Halacaridae compreende mais de mil espécies, classificadas em 51 gêneros marinhos. Ao menos metade dos gêneros inclusos na família pode ser encontrada na meiofauna intersticial. Dentre eles, os gêneros *Acarochelopodia*, *Actacarus*, *Anomalohalacarus*, *Arenihalacarus*, *Halacaroides* e *Scaptognathides* são exclusivamente psâmicos, ou muito raramente encontrados em outros ambientes, como *Anomalohalacarus*, que podem ser encontrados na superfície de ouriços irregulares, animais que por sua vez são habitantes de fundos arenosos (Bartsch, 2004). Estas espécies compartilham adaptações ao espaço crevicular, como corpos alongados e fusiformes e escleritos idiossomais reduzidos e/ou subdivididos.

Este capítulo descreve uma nova espécie de *Halacaroides*, gênero com ocorrências concentradas no hemisfério Sul. É a primeira ocorrência para o Brasil e a quarta espécie do gênero a ser descrita (Bartsch, 1981, 2008).

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Espécimes analisados e locais de coleta

Os indivíduos estudados foram coletados em areia da região entre marés na praia de Pitangueiras (23°49'S, 45°25'W), município de São Sebastião, SP. Porções de areia foram vigorosamente agitadas com água do mar em um balde e a fauna suspensa filtrada através de uma peneira de 50µm de poro. Os espécimes obtidos foram fixados em álcool a 70%. Os ácaros foram clarificados com ácido láctico e montados em meio de gelatina-glicerina (Green & MacQuitty, 1987). Os desenhos foram feitos com auxílio de uma câmara clara.

4.2.2. Abreviaturas utilizadas

Abreviações utilizadas na descrição: AD, placa anterior dorsal; AE, placa epimeral anterior; ds, seta dorsal, numerado em ordem anterior a posterior de ds-1 a ds-5; GA, placa genitoanal; glp, poros glandulares; GO, abertura genital; OC, placa ocular; PD, placa posterior dorsal; PE, placa epimeral posterior.

Pernas são numeradas de I a IV e os segmentos são nomeados, em ordem distal a proximal como tarso, tíbia, patela, telofêmur, basifêmur e trocânter; os podômeros do palpo são numerados P4 a P1.

A quetotaxia é referida desconsiderando-se os solenídios e as setas parambulacrais, do trocânter ao tarso. A posição das estruturas sobre a superfície do corpo são descritas de acordo como o sistema de notação proposto por Newell (1984).

4.3. Descrição

Gênero *Halacaroides* Bartsch, 1981

Ácaros de corpo fusiforme, arenícolas. Placas oculares reduzidas. Placa posterior dorsal sempre mais curta que a placa posterior dorsal. Poros glandulares não evidentes. Cinco ou seis pares de setas dorsais curtas, um par de setas adanais sobre a placa anal. Placa epimeral posterior subdividida. Rostro alongado, com margens paralelas e portando dois pares de setas maxilares. Segundo segmento do palpo com uma seta, terceiro com um espinho medial, quarto com três setas basais. Tarso I com três setas ventrais, solenídio e fâmulo adjacentes à lamela lateral da cavidade da garra. Tarso II com uma única seta ventral e um solenídio dorsomedial. Tarsos III e IV sem setas ventrais. Garras da perna I pouco mais curtas que as restantes. Garras mediais pequenas. Placa genital das fêmeas sem subdivisões.

Halacaroides sp. nov.

Material estudado

Três fêmeas e três machos, obtidos de areia grosseira sob influência de um pequeno córrego, Praia de Pitangueiras, São Sebastião, São Paulo, 01 de agosto de 2004, col. Pepato, A. R.

Figura 1: *Halacaroides* sp. nov.: **Fêmea** A- Idiossoma, dorsal. C- Idiossoma, ventral. D- Gnatossoma, ventral. **Macho:** B- Área genitoanal. E- Placa epimeral posterior. Barras de escala: A, C: 50 μm ; B, D-E: 25 μm .

Descrição das fêmeas

Idiossoma fusiforme, comprimento de 255-275 μm , largura de 108-133 μm . Placas dorsais sem ornamentação conspicua, exceto por ser perfurada nas suas camadas mais profundas por canalículos. AD, 61-68 μm de comprimento, 48-52 μm de largura com ds-1 inserido a 0.32-0.34 do seu comprimento.

Segundo a quinto pares de setas dorsais sobre a cutícula estriada. Placas oculares com 19-25 μm de comprimento, 9-12 μm de largura, com uma inserção muscular evidente na sua extremidade anterior. Dois pequenos escleritos, um anterior a OC, a meio caminho entre ds-2 e ds-3, o outro posterior a OC, anterior a inserção da perna IV. Placa posterior dorsal indivisa, PD com 38-48 μm de comprimento por 25-30 μm de largura. Par de setas adanais inseridas dorsalmente sobre a papila anal.

Placa epimeral anterior com 41-48 μm de comprimento, 78-86 μm de largura, com três pares de setas. Dois pares de pequenos escleritos presentes no ventre do idiossoma. Placa genital anal com 60-65 μm de comprimento, 51-55 μm de largura, com três pares de setas perigenitais; GO com 28-33 μm de comprimento, 30-35 μm de largura. Escleritos genitais sem setas subgenitais. Ovipositor invaginado entendendo-se 35-44 μm da margem anterior de GA. Três pares de acetábulos genitais cobertos pelos escleritos genitais.

Gnatossoma alongado, comprimento de 163-173 μm , largura de 38-43 μm . Rostro corresponde a 0.52-0.55 do comprimento do gnatossoma. Palpos com quatro segmentos; P2 com uma única seta inserida distalmente; P3 com um pequeno espinho medial; P4 com três setas em sua porção basal e dois espinhos distais.

Quetotaxia das pernas, o número de setas espiniformes indicadas entre parênteses: perna I: 1,2,2,5,10,6; perna II: 1,3,3,4,6(2),4; perna III: 1,2,2,4(1),6(2),3; perna IV: 1,0,3,4(1),6(2),3. Tarso I com 3/3 setas dorsal/ventral e um par de eupatídeos duplos. Tarso II com 3/1 setas dorsal/ventral, e um par de eupatídeos duplos, com membros desiguais. Tarso I com a lamela posterior da fossa da garra distintamente maior que a dos demais tarsos. Garras dos tarsos I-II apenas com um processo acessório dorsal, tarsos III-IV com garras que além do processo dorsal são pectinadas.

Figura 2: *Halacaroides* sp. nov.: **Fêmea** A- Perna IV. B-Perna II. C- Perna III. D- Perna I. E- Tarso I. Barras de escala: A-D: 50 μ m; E: 25 μ m.

Descrição dos machos

Idiossoma com 255-265 μ m de comprimento. Exceto pela área genital, similares às fêmeas na maior parte das características. Esclerito genital com 65-70 μ m de comprimento, 53-60 μ m de largura, com 41-44 setas perigenitais. Abertura genital com 24-26 μ m de comprimento, 9-11 μ m de largura, separada da margem anterior de GA por 36-38 μ m. Três pares de setas subgenitais sobre os escleritos genitais, sendo o par

anterior deslocado dos outros dois. Dois pares de acetábulos genitais posteriores comunicando-se diretamente com o exterior, par anterior interno ao esclerito genital. Espermatoforótipo estendendo-se 24-26 μm além da margem anterior de GA.

4.4 Discussão

O gênero *Halacaroides* foi proposto com base em duas espécies, *H. angustus* Bartsch, 1981 e *H. brevocularis* Bartsch, 1981, coletadas no Estreito de Magalhães, Chile (Bartsch, 1981).

Os exemplares brasileiros diferem de seus congêneres chilenos pela presença de três pares de setas subgenitais nos machos e nenhuma nas fêmeas, ao invés de cinco de duas, respectivamente, nas espécies chilenas. Ainda em relação à área genital, as espécies chilenas possuem cerca de 20 setas perigenitais e todos os acetábulos genitais sob os escleritos genitais em *H. angustus* e *H. brevocularis*, enquanto na espécie aqui descrita existem aproximadamente o dobro de setas perigenitais e os acetábulos genitais posteriores são externos.

A única ocorrência não sul-americana do gênero, *Halacaroides australiensis* Bartsch, 2008, foi obtida em uma praia australiana sob influência de água doce. Difere das demais espécies por possuir sete pares de setas dorsais no idiossoma, AE longitudinalmente dividido por uma faixa de cutícula membranosa, um único par de acetábulos genitais externos e cerca de vinte setas perigenitais nos machos, e um par de setas subgenitais na fêmea (Bartsch, 2008).

É interessante notar, de qualquer forma, que a espécie aqui descrita igualmente ocorre em uma praia sob influência de água doce. Como esse ambiente é pouco estudado

no hemisfério Sul quanto à fauna de halacarídeos, o gênero pode ser mais comum do que se supõe atualmente.

4.5. Referências

- Bartsch, I. 1981. Die Gattung *Anomalohalacarus* und *Halacaroides* (Halacaridae, Acari), geographische Verbreitung, Bestimmungstabelle und Beschreibung dreier neuer Arten. *Zoologische Beiträge, Neue Folge*, 27, 67–84.
- Bartsch, I. 2004. Geographical and ecological distribution of marine halacarid genera and species (Acari: Halacaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 34, 37-58.
- Bartsch, I. 2008. Halacarid mites (Acari: Halacaridae) in a freshwater influenced beach of North Stradbroke Island, Moreton Bay, Queensland. In: Davie, P.J.F. & Phillips, J.A. Proceedings of the Thirteenth International Marine Biological Workshop, The Marine Fauna and Flora of Moreton Bay, Queensland. *Memoirs of the Queensland Museum - Nature* 54, 117–130.
- Green J. & Macquitty M. 1987. *Halacarid mites*. Linnean Society of London/Estuarine and Brackish-Water Sciences Association & E.J. Brill/W, Backhuys, London, 128 pp.
- Newell, I. M. 1984. Biology of the Antarctic Seas. XV Antarctic Halacaroidea. - *Antarctic Research Series*, 40, 1-284.

Capítulo 5. Discussão geral e conclusões

A noção de que os Solifugae e Acariformes são ao menos similares tem longa história na literatura aracnológica e acarológica, ainda que sempre marginal (Dunlop, 1999). É só lembrar que um dos grupos mais familiares aos acarólogos, Rhagidiidae, teve seu nome cunhado como o diminutivo de *Rhax*, um gênero de Solifugae.

Assim que os primeiros estudos enfocando a morfologia dos testículos e espermatozóides dos Solifugae foram realizados, chamou-se atenção para o caráter derivado dessas estruturas e a similaridade com os Acariformes (Alberti, 1984). Mesmo assim, o caráter relacionado à existência de uma porção secretora no testículo nunca foi levado em conta nas inferências filogenéticas anteriores às apresentadas aqui. A ausência de carioteca no espermatozóide maduro foi incluída apenas em 2002 (Giribet *et al.* 2002).

Shultz (2007) critica Alberti & Peretti (2002) por, com base apenas na morfologia dos espermatozóides, terem sugerido que Solifugae e Pseudoscorpiones não eram proximamente relacionados. Ele assinala que eleger caracteres isolados em suporte a hipóteses de relacionamento pode levar a sistemática de volta ao subjetivismo e autoritarismo que a caracterizou em tempos idos.

Sua argumentação é metodologicamente correta. A análise filogenética é um teste de coerência e a homoplasia dos estados de caráter pode ser descoberta na medida em que sua distribuição é congruente ou não com a topologia recuperada. Mas obviamente a topologia depende da matriz empregada na inferência. Ao ignorar os caracteres propostos por Alberti & Peretti (2002) sem questionar a sua validade, Shultz (2007) também introduziu um viés subjetivo nas suas análises.

O problema que detectamos no uso da otimização direta (Wheeler, 1996) é que em análises combinadas de dados moleculares e morfológicos, qualquer possível viés introduzido nas matrizes morfológicas pode ser transmitido ao estabelecimento da homologia entre os nucleotídeos, assim reduzindo a eficiência do “teste” de coerência da análise filogenética por sua influência no estabelecimento da homologia entre os nucleotídeos.

Por princípio, a atividade do cientista é dirigida a obter evidências que ponham suas hipóteses, mesmo as “de estimação”, a prova. Se um algoritmo, ao

estabelecer a homologia entre os nucleotídeos, age produzindo uma matriz molecular que tende a ser congruente com os caracteres de outras fontes, esse objetivo fica comprometido.

Comparando-se as topologias apresentadas no capítulo I, percebe-se que as análises constrangidas, ainda que empreguem a otimização direta para regiões que perfazem metade do número de passos da árvore recuperada, são pouco sensíveis à matriz morfológica combinada. Ainda assim, salientamos que os valores de suporte apontados devem estar sobreestimados. É aqui sugerido que desenvolvimentos futuros na implementação das propostas de Redelings & Suchard (2005) podem levar à incorporação da incerteza embutida nas regiões de alinhamento ambíguo, ainda que em apenas em um marco bayesiano.

A posição dos ácaros Acariformes obtida no capítulo I é a chave para o emprego das características da morfologia interna para o estudo das relações dentro desse grupo. De fato, os ácaros Anactinotrichida ou Ricinulei, nunca ofereceram um marco útil para a polarização dos caracteres espermatológicos.

Os dados obtidos para os espermatozóides e trato genital dos Halacaridae confirmam as observações anteriores a respeito dos Prostigmata. Mais que isso, mostram um grande potencial para auxiliar, em uma análise que inclua outros aspectos da morfologia, a resolução da história evolutiva do grupo.

Em particular, a condição plesiomórfica do padrão de condensação da cromatina e das mitocôndrias no espermatozoíde maduro em *Rhombognathus*, o estabelecimento de apomorfias ligando *Arhodeoporus* e Compidognathinae e a proximidade entre *Halacarus* e *Thalassarachna*, se confirmadas por análises que incluam caracteres moleculares e da morfologia externa, sugerem linhas de investigação muito interessantes quanto à diversidade, biogeografia e fisiologia da família.

Poucos animais são capazes de utilizar as macroalgas como recurso alimentar. Giere (1993) cita além dos Rhombognathinae apenas alguns copépodes Cyclopoida e Ostracoda. Se *Rhombognathinae* é polifilético, a habilidade em lidar com esse item alimentar surgiu independentemente duas ou três vezes dentro da família, podendo envolver a evolução de enzimas diferentes.

Copidognathus inclui mais de um terço das espécies de Halacaridae, e é cosmopolita. Mas é composto por dezenas de grupos de espécies, que exibem alto

grau de endemismo em relação às regiões biogeográficas marinhas (e.g. Bartsch, 1985, 1998, 1999). O estabelecimento de um grupo externo sempre foi um problema para a revisão do gênero. Os dados espermatológicos apontam o gênero *Arhodeoporus* como um bom candidato a esse papel, o que pode levar ao aproveitamento desse gênero para o estudo de padrões biogeográficos marinhos. O mesmo pode ser dito quanto ao diversificado gênero *Halacarus*, na medida que se torna clara sua posição filogenética.

5.1. Referências

- Alberti, G. & Peretti, A. V. 2002. Fine structure of male genital system and sperm in Solifugae does not support a sister-group relationship with Pseudoscorpiones (Arachnida). *The Journal of Arachnology*, 30, 268-274.
- Alberti, G. 1984: The contribution of comparative spermatology to problems of acarine systematics. In: Griffiths, D. A. & Bowman, C. E. *Acarology VI, I. VIth Intern. Congr. of Acarology*, Ellis Horwood lim. Press, Edinburgh. Chichester, 479-490.
- Bartsch, I. 1985. Zur Verbreitung der *gibbus*-Gruppe (*Copidognathus*: Halacaridae: Acari) und Beschreibung zweier neuer Arten. *Acarologia*, 26(1), 28-35.
- Bartsch, I. 1998. A new species of the *Copidognathus pulcher* group (Acari: Halacaridae) from Western Australia: description of adults and juveniles and notes on developmental pattern. *Species Diversity*, 3(2), 187-200.
- Bartsch, I. 1999. *Copidognathus* (Halacaridae: Acari) from Western Australia: Five species of the *oculatus* group. *Records of the Western Australian Museum*, 19(3), 299-321
- Dunlop, J. A. 1999. Poecilophysidea: a forgotten arachnid order illustrating a forgotten phylogenetic hypothesis. *Newsletter of the British arachnological Society*, 85: 4–6.
- Giere, O. 1993. *Meiobenthology. The microscopic fauna in aquatic sediments*. Springer-Verlag, Berlim,. 328pp.

- Giribet, G., Edgecombe, G. D., Wheeler, W. C. & Babbitt, C. 2002. Phylogeny and systematic position of Opiliones: a combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics*, 18, 5-70.
- Redelings, B. D. & Suchard, M. A. 2005. Joint Bayesian estimation of alignment and phylogeny. *Systematic Biology*, 54(3), 401-18.
- Shultz, J. W. 2007. A phylogenetic analysis of the arachnid orders based on morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150, 221-265.
- Wheeler, W.C., 1996. Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics*, 12, 1-9.

Resumo

Este estudo buscou acessar a posição filogenética da ordem Acariformes, descrever a morfologia dos espermatozóides, secreções acompanhantes e espermiogênese dos ácaros halacarídeos, e, eventualmente, contribuir com o conhecimento da fauna de Halacaridae do Estado de São Paulo através da descrição de novas species. A posição filogenética dos Acariformes foi examinada com o emprego dos genes 18S, parte do 28S e morfologia de 91 táxons terminais. A hipótese considerada aqui como a que melhor incorpora os dados é a obtida com a análise dos dados matriz morfológica apresentada combinada com as sequências parcialmente alinhadas com o emprego da estrutura secundária como guia. As análises levaram a uma topologia que inclui um clado composto por (Palpigradi (Solfugae Acariformes) e outro por (Ricinulei Tetrapulmonata). A aparente estabilidade de alguns clados não recuperados aqui como Haplocnemata e Acari, é atribuída ao efeito da forma como a homologia molecular foi estabelecida nos trabalhos anteriores pela abordagem instrumentalista implementada no POY. Observações a respeito da espermiogênese, espermatozóides e secreções acompanhantes de dezesseis Halacaridae são apresentadas. A informação espermatológica suporta uma posição basal para o gênero *Rhombognathus*, com um padrão difuso de condensação da cromatina e mitocôndrias não modificadas, ao invés do padrão centrípeto e as mitocôndrias anulares dos outros gêneros, também suportam uma relação próxima do gênero *Arhodeoporus* e Copidognathinae e uma relação de grupo-irmão entre os gêneros *Halacarus* e *Thalassarachna*. Finalmente, o gênero *Halacaroides* é registrado para a costa brasileira pela primeira vez.

Abstract

This study aimed to assess the phylogenetic position of the order Acariformes, describe the sperm cell morphology, accompanying secretions and spermiogenesis of halacarid mites. Eventually, it was also intended to describe a new species and occurrences along the São Paulo State coastline. The phylogenetic position of Acariformes mites is examined employing SSU, partial LSU sequences, and the morphology of 91 extant terminals. The hypotheses regarded as better encompassing the evidence gathered is that yielded by the combined analysis of morphology and partially aligned sequences using the secondary structure as a guide to the alignment. It has yielded to a topology including a clade composed by (Palpigradi (Solfugae Acariformes) and other by (Ricinulei Tetrapulmonata). The seeming stability of certain clades not recovered here, as Haplocnemata and Acari, are regarded as the byproduct of the way as molecular homology was established by the instrumentalist approach implemented in POY inprevious studies. Ultrastructural observations on spermiogenesis, sperm cell and reproductive system of sixteen species belonging to Halacaridae are presented. The espermatological information supports a basal position for genus *Rhombognathus*, which presents a diphuse pattern of chromatin condensation and crested mitochondria, instead of the derivate centripetal pattern and annular mitochondria observed in the remaining clades, data also support a close relationship between the genus *Arhodeoporus* and Copidognathinae and sister group relationship between the genera *Halacarus* and *Thalassarachna*. Finally, the genus *Halacaroides* is recorded from the Brazilian coastline for the first time.

Apêndice 1

Descrição dos anexos eletrônicos

Junto aos volumes desta tese está anexo um CD-ROM com os seguintes arquivos:

1- versão em PDF da tese;

2- um arquivo formato FASTA intitulado “*alinhamento18S.fas*” contendo anotações referentes à estrutura secundária do gene 18S, que seguem a nomenclatura adotada na Fig. 2 do Capítulo 1. O arquivo contém ainda uma máscara indicando os nucleotídeos pareantes com sinais como “()”, “{}”, ou “<””, que sinalizam os membros de um par de nucleotídios, pontos “.”, que indicam nucleotídeos não pareantes e “*”, que indicam regiões de alinhamento ambíguo.

3- Um arquivo formato FASTA intitulado “*alinhamento28S.fas*”, usando a mesma notação utilizada no anterior, referente ao fragmento analisado do gene 28S e seguindo a nomenclatura utilizada na Fig. 3.

4- Dois arquivos contendo as matrizes morfológicas, intitulados *matrizA.ss* e *matrizb.ss*.

Apêndice2

Pepato, A. R. & Rocha, C. E. F. da 2007. Description of a new species of *Rhombognathus* (Halacaridae, Acari), its spermiogenesis and spermatozoa. *Journal of Natural History*, 41(37), 2433 - 2445

Description of a new species of *Rhombognathus* (Halacaridae, Acari), its spermiogenesis and spermatozoa

ALMIR R. PEPATO & CARLOS E.F. DA ROCHA

Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

(Accepted 9 July 2007)

Abstract

This is the first record of the subfamily Rhombognathinae on the Brazilian coast. A new species is described, *Rhombognathus levigatoides* sp. nov., which shares most diagnostic features with *R. levigatus* Bartsch, 2000, but differs from it by measurements of ds-1, dorsal plates, and spermatophorotype. A detailed account is provided of its spermiogenesis and sperm cell morphology. *Rhombognathus* sperm cells show features that should be regarded as probable plesiomorphies if contrasted with those found in the other two halacarid spermatozoa studied until now, *Halacarellus thomasi* and *Thalassarachna basteri*, such as the almost unmodified mitochondria, type of nuclear condensation similar to that observed in most Actinedida mites, complete acrosomal complex, and presence of a single kind of globular secretion.

Keywords: *Acari*, comparative spermatology, *Halacaridae*, *Rhombognathus*, new species, sperm cells, spermiogenesis

Introduction

The genus *Rhombognathus* comprises about 10% of all Halacaridae species, and has a world-wide distribution in marine algal beds. *Rhombognathus*, with the less diversified genera *Metarhombognathus*, *Rhombognathides* (both restricted to North Atlantic), and *Isobactrus* belong to the algivorous subfamily Rhombognathinae.

Rhombognathines are often numerically dominant in intertidal and estuarine halacarid assemblages. They are readily recognized when sorting marine mite samples because of their dark greenish idiosomal contents and short gnathosoma. However, their position as a monophylum is poorly supported by their external morphology. In his revision on Rhombognathinae, Abé (1998) found only two synapomorphies uniting the rhombognathine genera: the dark greenish idiosomal contents (a consequence of feeding on algae) and filamentous pharyngeal apodemes. Bartsch (2003a) could not find conclusive evidence either to dismiss or to support rhombognathine monophyly. Therefore, only the addition of new morphological and molecular data will improve our comprehension of their phylogenetic position among the halacarids.

Correspondence: Almir R. Pepato, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, travessa 14, No. 321, 05508-900 São Paulo, Brazil. Email: pepatto@ig.com.br

ISSN 0022-2933 print/ISSN 1464-5262 online © 2007 Taylor & Francis

DOI: 10.1080/00222930701567877

Because of their relative phylogenetic stability through taxonomical levels higher than species category, spermatological data are a candidate for providing the requirements of character resolution needed to clarify the position of *Rhombognathus* among the Halacaridae and Rhombognathinae, as well as for contributing to the resolution of other problems concerning Halacaridae phylogeny.

Spermatozoa combine a set of characteristics that make these cells suitable for comparative studies. First, they are cells with several well-defined characters; second, sperm morphology is shaped by the reproductive biology of animals, a decisive factor in defining the evolutionary trends. Finally, as a complete series of stages of cell differentiation can often be observed in a single male, doubts on the homology of cell structures can be easily settled. Sperm cell morphology has been studied in all major groups of Acari. The sperm cells are rather diversified within mites, although all are aflagellate. Spermatological results fit well with the division of Acari into Anactinotrichida and Actinotrichida (revisions in Alberti 1991 and Alberti and Coons 1999). To date, testes and spermiogenesis have been studied in only two species of halacarids, *Thalassarachna basteri* (Johnston, 1836) and *Halacarellus thomasi* (Newell, 1984) (Alberti 1980; Alberti and Meyer-Rochow 2002). In the present work the sperm cell morphology and spermiogenesis of *Rhombognathus levigatoides* sp. nov. is described along with its species description.

Material and methods

The specimens were collected from intertidal rocky shore algae at Baleia Beach, 23°46'S, 45°40'W; Pitangueiras Beach, 23°49'S, 45°25'W (both localities in São Sebastião, São Paulo State); Martim de Sá Beach and Island of Massaguaçu, 23°38'S, 45°24'W (Caraguatatuba, São Paulo State), and Lázaro Beach, 23°30'04.5"S, 45°08'17.2"W (Ubatuba, São Paulo State). Intertidal algae were sorted under a stereoscopic microscope and the material obtained was fixed in 4% formalin. Mites were cleared in lactic acid and mounted in glycerin jelly (Green and Macquitty 1987). The holotype was deposited in the Museu de Zoologia of the University of São Paulo (MZUSP). Drawings were made with the aid of a camera lucida.

Abbreviations used in the description: AD, anterior dorsal plate; AE, anterior epimeral plate; ds, dorsal setae, from anterior to posterior: ds-1 to ds-5; ER, endoplasmatic reticulum; GA, genitoanal plate; GO, genital opening; gp, gland pores; OC, ocular plate; PD, posterior dorsal plate; PE, posterior epimeral plate; RER, rough endoplasmatic reticulum; legs numbered I–IV and the segments, in distal to proximal, named: tarsus, tibia, genu, telofemur, basifemur, and trochanter; palpal segments in same order numbered P4–P1; VS, ventral shield; ω , solenidion; ε , famulus.

Chaetotaxy formula was given without solenidia and parambulacral setae, from trochanter to tarsus. The position of certain structures was described according to Newell (1984), using the decimal system.

For transmission electron microscopy, males belonging to *Rhombognathus levigatoides* sp. nov. were collected from intertidal algae at Pitangueiras Beach. The gnathosoma was pulled out and legs extracted from living mites with a fine entomological needle in ice-cold fixative (2.5% glutaraldehyde buffered to pH 7.2 in 0.1 M cacodylate buffer). Following 2 h in cold fixative, the mites were rinsed in buffer solution and postfixed in 2% OsO₄ for 2 h, rinsed again with buffer solution, immersed in uranyl acetate for 12 h and dehydrated in a graded series of ethanol. Material was embedded in Spurr's resin with propylenoxide as intermedium. Polymerization took 12 h at a temperature of 70°C.

Semi-thin sections were stained with toluidine-blue and observed under light microscope in order to allow general orientation. Ultra-thin sections through selected regions were obtained with the aid of a Leica Ultracut R ultramicrotome, stained with lead citrate and observed under a MET LEO 906E Zeiss transmission electron microscope.

Systematic account

RHOMBOGNATHINAE Viets, 1927

Idiosoma dark green or black. Ocular plates with one or two corneae. Short palps, three- or four-segmented, attached laterally and compressed laterally against gnathosoma. Both tritrostral and basistrostral setae on rostrum. Carpite present between end of tarsus and central sclerite.

Genus *Rhombognathus* Trouessart, 1888

Dorsal plates well-developed, sometimes fused. Ocular plates with two setae and two corneae. Posterior dorsal plates with one or two pairs of setae. Adanal setae on anal plate. Ventral plates often fused. Epimeral plates often with adjunct setae. Adults with two, rarely one pair of subgenital setae. Palp four-segmented, P2 with single dorsal setae, P3 without setae, and P4 with three setae. Tarsus I with dorsolateral solenidion and famulus. Tarsus II with a dorsolateral solenidion. Males with plumose parambulacral setae on tarsus IV. All tarsi with lateral claws only and without ventral setae. Two or three nymphal stages. If only two nymphal stages present, they are proto- and tritonymph.

***Rhombognathus levigatoides* sp. nov.**

(Figures 1–8)

Material examined

Holotype: female (MZUSP), on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP. Paratypes: three females (Author's collection), on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; 12 females (Author's collection), on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; three males (MZUSP) on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; 14 males (Author's collection), on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; three tritonymphs (MZUSP) on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; six tritonymphs (Author's collection), on intertidal algae at Massaguaçu Island, Caraguatatuba, 16 March 2001, coll. BIOTA/FAPESP; female (Author's collection), on intertidal rock shore at Martim de Sá Beach, Caraguatatuba, 19 September 2001, coll. BIOTA/FAPESP; female (Author's collection), on intertidal rocky shore at Baleia Beach, São Sebastião, 16 October 2001, coll. BIOTA/FAPESP; tritonymph (Author's collection), on *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 at Lázaro Beach, Ubatuba, July 1991, coll. R. Curvelo; female (Author's collection), on *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 at Lázaro Beach, Ubatuba, July 1991, coll. R. Curvelo.

Description

Measurements as shown in Table I.

Figure 1. *Rhombognathus levigatoides* sp. nov. (A) Idiosoma, dorsal; (B) ornamentation at medial portion of PD; (C) genital opening; (D) idiosoma, ventral; (E) ovipositor; (F) gnathosoma, medial; (G) gnathosoma, ventral. (A, B, D–G) Female; (C) male. Scale bars: 50 μ m (A, D); 25 μ m (B, C, E–G).

Female. Dorsal plates almost smooth, lateral portions of PD, medial AD and OC pierced by canaliculi (Figure 1A). Medial PD slightly reticulated as shown in Figure 1B. Anterior dorsal plates with ds-1 at 0.45–0.56 of AD length, such setae 23–25 μ m long. First pair of gland pores at same level as leg I insertion. Posterior line of muscle scars at 0.79–0.84 of AD overall length. Pairs of ds-2, ds-3, gp-2 and gp-3 on OC, which also bears a couple of corneae and a pore canaliculus. Length/height ratio of OC 1.80–2.34. Posterior dorsal plate with only pair of ds-4 at 0.11–0.18 of its length, and pair of gp-4 at its posterior margin. Anterior dorsal plate 1.00–1.18 as broad as PD. Adanal setae dorsal on anal papilla.

Gnathosoma short, length: width ratio equal to 1.00–1.23. Rostrum 26–30 μ m long, 15–18 μ m wide, shorter than gnathosoma basis and as long as 0.36–0.41 times gnathosoma length.

Ventral plates AE, PE, and GA fused in a ventral shield, apart from anal plate by a band of membranous cuticle. Both AE and PE with single pair of adjunct setae. Genital area with five pairs of perigenital setae. Genital sclerites with two pairs of subgenital setae. Ovipositor 57–61 μ m long, with three pairs of posterior and two pairs of anterior eugenital setae (only three individuals with everted ovipositor). Eugenital setae are strong dorsally pectinate spines (Figure 1E).

Figure 2. *Rhombognathus levigatoides* sp. nov. (A) Leg I; (B) tarsus I; (C) tarsus IV; (D) leg IV; (E) tarsus IV; (F) leg II; (G) tarsus III; (H) tarsus II; (I) leg III. (A–D, F–I) Female; (E) male. Scale bars: 50 μ m (A, D, F, I); 25 μ m (B, C, E, G, H).

Leg chaetotaxy, bipectinate setae referred with roman numerals: leg I, 1,2,7,5,5(II),3; leg II, 1,2,7,5,5(I),3; leg III, 1,2,4,3,5(I),4; leg IV, 0,2,4,3,5(II),3. Telo femora I–IV with 5/2, 5/2, 3/1, and 3/1 dorsal/ventral setae; length: height ratio of telofemora I–IV: 1.94–2.17; 1.90–2.36; 1.88–2.39; 1.77–2.29. Tarsus I with papiliform famulus, setiform solenidion and pair of doublet eupathidia (Figure 2B). Tarsus II with a setiform solenidion and a pair of doubled eupathidia (Figure 2H). Tarsus III with a single eupathid and a faintly pectinated spine. Tarsus IV with double slender setae and spine similar to that on tarsus III. Lateral claws well-developed, medial one lacking. Dorsal accessory process pectinate, with five to seven teeth.

Male. Similar to female in most features. Anterior: posterior dorsal plates width ratio 1.00–1.21. Posterior line of muscle scars on AD at 0.74–0.79 of its length. Genital area with 18–23 branched perigenital setae (Figure 1C). Genital sclerites with two pairs of subgenital setae. Spermatophorotype 40–49 μ m long, 35–50 μ m wide, surpassing anterior edge of GO by 16–22 μ m. Tarsus IV with a plumose setae and a spine as parambulacral setae.

Tritonymph. Dorsal plates reduced, ventral plates AE, PE, and GP separated from each other by bands of striated cuticle. Chaetotaxy of epimeral plates similar to adults, although

Figure 3. *Rhombognathus levigatoides* sp. nov., tritonymph. (A) Idiosoma, dorsal; (B) idiosoma, ventral; (C) leg I; (D) leg IV; (E) leg III; (F) leg II. Scale bars: 50 µm (A, B); 25 µm (C–F).

adjunct seta is lacking asymmetrically in some individuals. On genital plate, three pairs of setae, the medial one tiny and close to the primordial genital opening.

Leg chaetotaxy, bipectinate setae as Roman numerals: leg I, 1,2,6,5,5(II),3; leg II, 1,2,6,5,5(I),3; leg III, 1,2,4,3,5(I),4; leg IV, 0,2,2,3,5(II),3. Telofemora I–IV with 4/2, 4/2, 3/1, and 2/0 dorsal/ventral setae.

Remarks

Rhombognathus levigatoides sp. nov. shares with *R. levigatus* Bartsch, 2000 all diagnostic traits presented in the original description of the latter species: dorsal plates faintly

Figure 4. Two early stages of spermiogenesis. (A) First stage with batches of heterochromatin, and dense cytoplasm; (B) second stage without heterochromatin, picture shows single crest mitochondria (arrow) and Golgi body [G]; (C) second spermatid stage. Scale bars: 1 μm (A, C); 0.5 μm (B).

ornamented; PD with a single pair of dorsal setae; AE, PE, and GP fused in a ventral shield; only an adjunct setae on AE and PE; female with five pairs of perigenital setae; male with 10–12 pairs of branched perigenital setae; gnathosoma short; telofemora I–IV with 5/2, 5/2, 3/1, 3/1 dorsal/ventral setae; accessory process with five to six teeth in *R. levigatus* and five to seven in the species described herewith. *Rhombognathus levigatus* was described from the Great Barrier Reef, Queensland, and the Dampier Archipelago, Western Australia (Bartsch 2000, 2003b).

Figure 5. (A) Intermediate spermatids: note the plasmalemmal infoldings; (B) spermatids with heterochromatin almost fully condensed: note mitochondria [M] of the somatic tissue between spermatids, acrosomal vesicles [AV] and thick and linear acrosomal filament [AF]; (C) mature sperm cells within cytoplasm of the somatic cells of germinative portion of testis. Scale bars: 1 µm.

However, the Brazilian specimens differ from the Australian species in some measurements, allowing us to consider it to be a new species. Whereas ds-1 is 12 µm in the holotype of *R. levigatus*, it is 19–25 µm long in males and 23–25 µm long in females of *Rhombognathus levigatoides* sp. nov.; AD: PD width ratio is 0.85 in *R. levigatus* and 1.00–1.21 in the new species described here; and, finally, in the Brazilian species the spermatophorotype is 40–49 µm long whereas in *R. levigatus* it measures 60 µm.

Figure 6. (A) Lumen of testis. Mature sperm cells are surrounded by somatic tissue and are delivered in testis lumen [Lu]. Then spermatozoa are coated with secreted material produced in the glandular portion: note microvilli and dense apico-lateral cell borders indicative of zonulae adhaerens among cells; (B) detail of a cell from the secretory portion of testis. N, nucleus. Scale bars: 1 μ m.

Sperm cells, spermatogenesis, and accompanying secretions

Testis

The testis, similarly to other Actinotrichida and Solifugae (Alberti and Peretti 2002), consist of a dorsal germinative portion with spermatids and a ventral glandular, RER-rich portion (Figure 6A, B). Between them, a lumen contains mature spermatozoa and accompanying secretions. Spermatids are roughly ordered from earlier to later stages from dorsal to ventral regions of the germinative portion.

Figure 7. (A) Mature spermatozoa; (B) striated body within sperm cell. AF, acrosomal filament; AV, acrosomal vesicle. Scale bars: 0.5 μ m.

Spermiogenesis

- (1) Earliest spermatids have large nuclei containing patches of heterochromatin (Figure 4A). Cytoplasm is electron-dense, with scattered mitochondria. Plasmalemma is folded at one side of the spermatids. Similar to all later stages, mitochondria are small, most of them with a single medial crest. In the following stage (Figure 4B, C), heterochromatin has disappeared. Besides mitochondria, ribosome, and ER, a Golgi body can be found midway between the nucleus and the cell membrane (Figure 4B). No centrioles were found.
- (2) Nuclear condensation is of the fibrillar type. At the beginning of nuclear condensation, the cell membrane folds deeply and approaches the nuclear membrane. Infolds are not evenly distributed, but restricted to one half of the spermatid. The acrosomal complex is complete, including a flattened vesicle and a thick acrosomal filament (Figure 5A, B).
- (3) Sperm cell maturation is completed at the ventral portion of the germinal part, close to the testicular lumen (Figure 6A). As a final step in spermiogenesis, cytoplasm of later spermatids undergoes an intense condensation. Mature spermatozoa are cells with irregular shape prior to inclusion in their individual coats of secretions. Dissimilar to all earlier stages, cells are separated from each other by broad spaces filled with somatic cell cytoplasm (Figure 5C). When enclosed by their coats of secretion, sperm cells assume a globular shape. After condensation, membrane pleats become a "striated body" on the side opposite to the acrosomal complex (Figure 7B).
- (4) Accompanying secretions originate from the glandular portion of testis, where microvilli-rich areas could be observed (Figure 6A, B). Three kinds of secretions were found: a thick individual coat surrounding each sperm cell; globular bodies of

Figure 8. (A) Vas deferens; (B) ductus ejaculatorius, the wall is composed by a thin epithelium associated with muscle fibers (arrows): note amorphous secretion on the left side of the picture and spermatozoa surrounded by globular bodies of secretion; (C) light micrograph of a cross-section through a male *Rhombognathus*: note general aspect of prospective spermatophore, with a secreted center upon which the sperm is laid. MG, excretory portion of midgut; N, nucleus of epithelial cell. Scale bars: 2 μ m (A); 1 μ m (B); 25 μ m (C).

Table I. Measurements (in μ m) from individuals of *Rhombognathus levigatoides* sp. nov.

	Female		Male		Tritonymph	
	Length	Width	Length	Width	Length	Width
Idiosoma	273–288	183–193	243–263	150–178	228–265	140–170
Gnathosoma	70–74	71–60	64–69	50–61	56–60	45–51
AD	82–97	93–98	83–94	80–91	63–79	62–80
PD	118–125	82–95	108–127	77–85	80–90	56–69
OC	65–75	31–37	61–72	34–44	47–60	20–27
VS	198–233	183–195	180–200	150–178	–	–
AE	–	–	–	–	59–70	143–123
GA	–	–	–	–	35–41	31–40
GO	56–62	22–31	32–35	17–25	–	–

secretion filling interstices between them, and an amorphous material. The sperm cells were also found inside the *vas deferens* (Figure 8A) and *ductus ejaculatorius* (Figure 8B, C), both thin-walled ducts consisting of a single-layered epithelium. The latter also had associated muscle fibres (Figure 8B). Inside it, the above-mentioned amorphous secretion constitutes a core, and sperm cells and secretion bodies are deposited around it (Figure 8A–C).

Discussion

Spermiogenesis and sperm cell morphology have been described for only two species of Halacaridae mites, *Thalassarachna basteri* (Johnston, 1836) and *Halacarellus thomasi* (Newell, 1984) (Alberti 1980; Alberti and Meyer-Rochow 2002). Using the out-group criterion, and considering current knowledge on Actinedida spermatology, the sperm cells, accompanying secretions, and spermiogenesis described above have several traits that should be regarded as plesiomorphies, suggesting that *Rhombognathus* belongs to an early branch of the Halacaridae stem.

The nuclear condensation process in both *T. basteri* and *H. thomasi* begins close to the nuclear envelope and progresses centripetally. The pattern found in *Rhombognathus* is similar to that found in most Actinotrichida (Alberti 1980).

Surface modifications have been reported in several other Actinotrichida mites and were regarded by Alberti (1991) as a characteristic feature of this taxon. Membrane infoldings in *Rhombognathus* are similar to those found in *Cyta latirostris* (Herrmann, 1804) and *Tetranychus urticae* Koch, 1836, and resemble simple pleats of plasmalemma. In *Halacarellus thomasi*, the periphery of the spermatozoa has thin centripetally pointing tubes that resemble those pleats. However, both *Halacarellus* and *Thalassarachna* species have electrodense tubules crossing the cytoplasm. These tubules and the ring-like infolding dividing the cell into two distinct halves in *T. basteri* are different structures. Indeed, there is the possibility that these structures appear inside the cytoplasm, arising from vesicular structures of spermatid cytoplasm and fuse with the cell membrane later (Alberti and Meyer-Rochow 2002). Therefore, the infoldings of *Rhombognathus* spermatozoa are probably plesiomorphic, while the presence of electrodense tubules and ring-like infolds in *Thalassarachna* should be regarded as apomorphies.

The presence of a complete acrosomal complex and mitochondria are undoubtedly plesiomorphic traits. *Halacarellus thomasi* contains a structure that remotely resembles an acrosomal vesicle, although the actual nature of this remains to be established. The more striking difference between *Rhombognathus* and the other two Halacaridae species is the division of the sperm cells into two halves (Alberti and Meyer-Rochow 2002). Although pleats of plasmalemma arise only on one side of the early spermatid membrane, these do not become a clearly distinct portion in the mature spermatozoa. The other known halacarid mature sperm cells lack mitochondria.

Both *Halacarellus* and *Thalassarachna* species have the spindle-shaped secretion termed “complex body” by Alberti and Meyer-Rochow (2002), besides globular electro translucent bodies of secretion. A rather structured secretion, which shelters the sperm aggregates, could be recognized beside an amorphous secretion. This structured secretion is lacking in *Rhombognathus levigatoides* sp. nov. Bodies of secretion in *Rhombognathus* belong to a single class, all globular and with granulose aspect. There are no sperm aggregates, and the core of the “sperm droplet” is amorphous.

The spindle-shaped bodies of secretion are a possible apomorphy of a subset among Halacaridae since no equivalent material has been found among sperm aggregates in other Acari. Regarding the presence of sperm aggregates, however, out-group comparison does not allow an unambiguous conclusion: other Actinotrichida present both conditions.

Acknowledgements

Authors wish to thank Dr. Rita Rosário Curvêlo (Depto Oceanografia Biológica, IO-USP), and the researchers' staff of the project "Benthic marine biodiversity on the State of São Paulo" (BIOTA/Fapesp program; proc. no. 1998/07090-3) who kindly provided most of the specimens for systematics. We would also like to express our gratitude to Dr. Marta Maria Antoniazzi, Dr. Sylvia Mendes Carneiro, and Dr. Carlos Jared (Laboratório de Biologia Celular, Instituto do Butantã, Brazil) who allowed the use of TEM, and made useful suggestions about microscopy techniques. We also thank Mr. Gaspar Ferreira de Lima (Depto de Histologia e Embriologia of the University of São Paulo, ICB-USP) for his skilful help on transmission electron microscopy. Special thanks are also due to Dr. Gerd Alberti (Ernst-Moritz-Arndt University, Greifswald) and to Dr. Ilse Bartsch (Forschungsinstitut Senckenberg, Hamburg) for their useful criticisms on the manuscript. This paper was supported by CAPES and FAPESP. The collecting work for TEM purposes was done using the facilities of the CEBIMar-USP, and most of the TEM work was done at the Laboratório de Biologia Celular, Instituto do Butantã.

References

- Abé H. 1998. Rhombognathine mites. Taxonomy, phylogeny, and biogeography. Hokkaido: Hokkaido University Press. 219 p.
- Alberti G. 1980. Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiocyto-genese der Milben (Acari). II. Actinotrichida. Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 104:144–203.
- Alberti G. 1991. Spermatology in the Acari: systematic and functional implications. In: Schuster R, Murphy PW, editors. The Acari: reproduction, development and life-history strategies. London: Chapman and Hall. p 77–105.
- Alberti G, Coons LB. 1999. Acari-mites. In: Harrison FW, editor. Microscopic anatomy of invertebrates. Volume 8C, New York: Wiley-Liss. p 515–1265.
- Alberti G, Meyer-Rochow VB. 2002. Ultrastructural investigations of testes and spermiogenesis in two species of halacarid mites (Halacaridae, Actinedida, Actinotrichida): *Thalassarachna basteri* from the Baltic Sea and *Halacarellus thomasi* McMurdo Sound (Antarctica). Arthropod Structure and Development 30:315–328.
- Alberti G, Peretti AV. 2002. Fine structure of male genital system and sperm in Solifugae does not support a sister-group relationship with Pseudoscorpiones (Arachnida). The Journal of Arachnology 30:268–274.
- Bartsch I. 2000. Rhombognathinae (Acari: Halacaridae) from the Great Barrier Reef, Australia. Memoirs of the Queensland Museum 45:165–203.
- Bartsch I. 2003a. The subfamily Rhombognathinae: developmental pattern and re-evaluation of the phylogeny (Arachnida, Acari, Halacaridae). Senckenbergiana Biologica 82:15–57.
- Bartsch I. 2003b. Rhombognathinae mites (Halacaridae: Acari) from Dampier, Western Australia: taxonomy and biogeography. In: Wells FE, Walker DI, Kirkman H, Lethbridge R, editors. The marine fauna and flora of Dampier, Western Australia. Perth: Western Australian Museum. p 255–280.
- Green J, Macquitty M. 1987. Halacarid mites. London: Linnean Society of London/Estuarine and Brackish-Water Sciences Association and E. J. Brill/W. Backhuys. 178 p.
- Newell IM. 1984. Biology of the Antarctic seas. XV Antarctic Halacaroida. Antarctic Research Series 40:1–284.