UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

THAIANY MIRANDA COSTA

Morfologia das glândulas sexualmente dimórficas em
Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Morphology of sexually dimorphic glands in Gonyleptidae
(Arachnida: Opiliones: Laniatores)

São Paulo

2017

THAIANY MIRANDA COSTA

Morfologia das glândulas sexualmente dimórficas em
Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Morphology of sexually dimorphic glands in Gonyleptidae
(Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção de título de Mestre
em Ciências, na Área de Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Hirata
Willemart

São Paulo

2017

Ficha catalográfica

Costa, Thaiany M

Morfologia das glândulas sexualmente dimórficas em
Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

vi + 60 páginas

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia

1. Gonyleptidae 2. Dimorfismo 3. Glândulas 4.
Morfologia 5. Ultraestrutura

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Rodrigo Hirata Willemart (orientador)

*Aos familiares e principalmente ao meu
amor Fran*

Agradecimentos

Àqueles que me concederam a vida e os melhores momentos da minha vida. Agradeço imensamente, aos meus familiares por todo o incentivo e motivação para concluir a dissertação. Sem dúvidas, sem vocês eu não teria ido até o fim. Obrigada vózinha pelas comidas maravilhosas que a Sra. é especialista. Por sempre estar presente me apoiando. Obrigada mamis linda (mais conhecida como fofis), você é essencial em todas as etapas da minha vida. Ao meu pai por ficar feliz e motivar os meus estudos. Agradeço aos meus irmãos Thais e Lucas, amo vocês demais e sei que uma vitória de algum de nós, é sempre uma vitória dos três. Obrigada Lucca e Lu por serem cunhados companheiros, por toda a diversão, saídas e comilanças. Obrigada tio, tia e Vava por fazerem parte de todas as conquistas da nossa família. Agradeço principalmente ao meu melhor amigo, companheiro de todas as horas, por me fazer acreditar que os sonhos se realizam e por realizar eles juntamente comigo. Muito obrigada Fran. Te amo muito e sem você eu não teria nem começado o mestrado, você foi essencial desde a entrevista do mestrado, rs.

Durante esses sete anos de área acadêmica, devo muito ao meu orientador Rodrigo. Obrigada por dispendir muito tempo acreditando no meu trabalho e me ensinando cada passo da pesquisa pacientemente sempre. Obrigada pelos conselhos e por ser um excelente orientador. Isso com certeza é a diferença profissional na vida dos seus orientandos.

Momentos de diversão sempre estão garantidos com vocês, Gabi e Carol. Vocês são primordiais para mim. Amo contar as novidades e relembrar os momentos de faculdade. Obrigada por cada conselho e motivação. Vocês são demais.

Agradeço aos membros do LESCA (Jéssica, Júlio, Avatar, Norton, Nathália, Gabriel, Guilherme) pelas conversas, discussões, reuniões e por toda a ajuda durante a IC e o mestrado. Muito bom poder compartilhar alguns sábados de reuniões com vocês. Obrigada pelo companheirismo e por sempre corresponderem quando precisei de ajuda.

Aos técnicos Ênio e Phillip pela paciência em todas as sessões de MeV. Por serem tão bons no que fazem e por me ajudarem a concretizar o mestrado. Agradeço o técnico Waldir por toda ajuda durante todo o processo para microscopia eletrônica de transmissão. E também ao Prof. Alberto pela assistência no laboratório de microscopia

eletrônica. Agradeço o Prof. Federico, por deixar eu usar o microscópio para tirar as fotos das minhas lâminas e a sua aluna Stefania por me ensinar pacientemente a utilizar o equipamento.

Agradeço as inúmeras pessoas que coletaram os animais que trabalhei e que depositaram no Museu de Zoologia de São Paulo. Ao professor Ricardo Pinto-da-Rocha que na posição de curador possibilitou o acesso aos exemplares. Aproveito para agradecer o técnico Mauro do MZSP por toda ajuda quando precisei retirar e devolver os exemplares. E agradeço o Alípio por me salvar quando precisei de algum animal que eu precisei de última hora,

Obrigada Avatar por toda a ajuda e conselhos durante a histologia. Obrigada Norton e Gui por terem coletado *P. striatus* para mim. Obrigada também a todos que fizeram um esforço para a coleta dos animais no Rio de Janeiro, em especial ao Rodrigo que investiu tempo e financiamento para isso acontecer. Obrigada João, Marília, Alípio e Avatar por ajudarem na procura pelos animais no RJ. Obrigada Alfonso por me ajudar com as fotografias.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo financiamento do projeto.

Sumário

Introdução geral.....	1
Capítulo 1: Dimorfismo sexual em aberturas glandulares das pernas de três subfamílias de Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores).....	9
Tabelas e Figuras.....	26
Capítulo 2: Morfologia interna das glândulas sexualmente dimórficas de <i>Progonyleptoidellus striatus</i> Roewer 1913 (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae).....	40
Figuras.....	54

Introdução geral

A classe Arachnida possui atualmente 12 ordens, dentre elas Opiliones que possui cerca de 6500 espécies descritas (Kury et al 2014). Quanto ao número de espécies, opiliões perde apenas para os Acariformes, Parasitiformes e Araneae (Sharma et al 2014). Opiliões são divididos entre quatro subordens viventes e monofiléticas: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi e Laniatores (Kury 2013). O grupo basal Cyphophthalmi agrupa animais pequenos, com cerca de 1-6 mm (incluindo as pernas) de comprimento. Com 208 espécies descritas eles são encontrados por todo mundo (com exceção da Antártida) (Giribet et al 2012, Kury 2017). Dyspnoi possui 387 espécies descritas e é um grupo restrito ao hemisfério norte (Pinto-da-Rocha e Giribet 2007). Com 1810 espécies descritas os Eupnoi são comuns nas áreas temperadas do hemisfério norte, mas são encontrados em outros hemisférios também (Pinto-da-Rocha e Giribet 2007). Finalmente, a ordem Laniatores possui 4248 espécies descritas e seus representantes vivem predominantemente nos trópicos (Pinto-da-Rocha e Giribet 2007, Kury 2014). São animais com a maior variação em sua morfologia externa e em seus comportamentos (Pinto-da-Rocha e Giribet 2007, Buzatto e Machado 2014).

Embora haja exceções, a maioria dos opiliões possui hábitos noturnos e durante o dia eles se abrigam sob troncos, no solo, em cavernas, no folhiço sob pedras ou em arbustos (Hoenen e Gnaspini, 1999, Curtis e Machado 2007). A alimentação inclui desde animais vivos ou mortos até vegetais e fungos (Acosta e Machado 2007). Para a defesa eles possuem alguns comportamentos característicos, como: fugir, fazer tanatose, autotomizar pernas, pinçar com os pedipalpos ou as quelíceras. A cutícula espessa também fornece proteção mecânica (Souza e Willemart 2011, Segovia et al 2015). A mais conhecida forma de defesa entre o grupo é a liberação de uma secreção odorífera pelas glândulas que se situam na região dorso-lateral do cefalotórax (Hara e Gnaspini 2003, Gnaspini e Hara 2007).

Apesar de opiliões possuírem olhos, há pouca informação sobre suas capacidades além de detectar variações de luminosidade e distinguir paredes pretas ou brancas (Pabst 1953). Além disso, são animais com fototaxia negativa (Willemart et al 2009). A visão tipicamente parece não influenciar a captura de presas ou detecção de coespecíficos (Willemart et al 2009). Quanto à detecção à distância por estímulos mecânicos, opiliões não possuem tricobótrios que são responsáveis por detecção de correntes de ar. E eles

não possuem órgãos metatarsais ou similares que são responsáveis por detectar vibrações de substrato (Willemart et al 2007). Com isso, opiliões são dependentes de estímulos químicos em diversos contextos: na alimentação (Willemart e Chelini 2007, Costa e Willemart 2013, Costa et al 2016a), na comunicação e no reconhecimento intra e interespecífico (Machado et al 2002, Donaldson e Grether 2007, Grether e Donaldson 2007, Chelini et al 2009, Willemart e Hebets, 2011; Teng et al 2012) e na aprendizagem (Santos et al 2013, Costa et al 2016b).

Na frente sexual, há evidências morfológicas nas quatro subordens de glândulas que são dimórficas sexualmente. Provavelmente são usadas em um contexto sexual uma vez que somente um dos sexos as possuem (Darwin 1871). Em Cyphophthalmi, os machos possuem glândulas tarsais nas pernas IV e também glândulas na parte anal e external, porém todas com funções desconhecidas até o momento (Giribet e Prieto 2003, Willemart e Giribet 2010). Alguns machos das subordens Dyspnoi e Eupnoi possuem glândulas que são utilizadas no acasalamento e são encontradas nas quelíceras e no pênis respectivamente (Martens 1969, Martens 1973, Martens e Schawaller 1977, Shultz 2005, Willemart et al 2006, Macias-Ordóñez et al 2010, Burns et al 2013). A subordem Laniatores possui aproximadamente 65% das espécies descritas para a ordem Opiliones (Shultz e Pinto-da-Rocha 2007, Kury 2014), mas poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com glândulas sexualmente dimórficas. São apenas seis trabalhos publicados sobre a morfologia das glândulas (Willemart et al 2007a, Willemart et al 2010, Proud e Felgenhauer 2011, 2013, Fernandes e Willemart 2014, Rodriguez e Townsend Jr 2015), amostrando 45 espécies que possuem dimorfismo sexual nesta subordem. Além disso, há três trabalhos que testaram a utilização das glândulas sexualmente dimórficas. As secreções químicas parecem ser deixadas no substrato pelo contato de diferentes regiões do corpo do animal ou também podem ser esfregadas no próprio corpo (Fernandes e Willemart 2014, Murayama e Willemart 2015). A quantidade de espécies amostradas ainda é inexpressiva frente ao número de espécies de Laniatores. Acrescentado a isso, muitos pesquisadores ao descreverem novas espécies dessa subordem notam um intumescimento e escurecimento (que tipicamente são glândulas sexualmente dimórficas) nas pernas de várias espécies e estes podem ser utilizadas como caráter taxonômico (Kury e Pinto-da-Rocha 2007, DaSilva e Pinto-da-Rocha 2010, Townsend et al 2010). Porém, dado o grande número de espécies descritas para a subordem Laniatores, ainda é cedo para fazer alguma inferência filogenética

entre os grupos em relação à morfologia das glândulas sexualmente dimórficas e a função continua sendo desconhecida.

Neste contexto, o meu projeto de mestrado inicialmente tinha como objetivo a descrição da morfologia externa da perna I (basitarso) e perna IV (metatarso) de 11 espécies da subfamília Progonyleptoidellinae. Infelizmente não foi possível realizar a microscopia eletrônica de varredura com as 11 espécies, porque cinco delas não estão depositadas no Museu de Zoologia de São Paulo nem no Museu Nacional no Rio de Janeiro. Fizemos um esforço para coletar duas espécies (*Gonyleptoides acanthoscelis*, *Gonyleptoides curvifemur*) no Rio de Janeiro e durante seis dias de campo essas espécies não foram encontradas. Posteriormente decidimos ampliar o projeto para grupos irmãos de Progonyleptoidellinae. Utilizamos espécies das subfamílias Gonyleptinae e Sodreaninae a fim de realizar comparações filogenéticas entre elas. Como estudos sobre a morfologia interna de glândulas em Opiliones são escassos e podem trazer importantes informações sobre o funcionamento e composição das secreções, estudamos também a morfologia interna de glândulas das pernas I (basitarso) IV (metatarso) de uma espécie de Progonyleptoidellinae (*Progonyleptoidellus striatus*). Geramos dois capítulos para a composição dessa dissertação. Capítulo 1: Dimorfismo sexual em aberturas glandulares das pernas de três subfamílias de Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores) e Capítulo 2: Morfologia interna das glândulas sexualmente dimórficas de *Progonyleptoidellus striatus* Roewer 1913 (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae)

Referências Bibliográficas

- Acosta LE, Machado G. 2007 Diet and Foraging, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), Harvestmen: **The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, pp. 309-338.
- Burns MM, Hedin M, Shultz JW. 2013 Comparative analyses of reproductive structures in Harvestmen (Opiliones) reveal multiple transitions from courtship to precopulatory antagonism. **Plos One**, v. 8, 1-11.
- Buzatto BA, Machado G. 2014 Male dimorphism and alternative reproductive tactics in harvestmen (Arachnida: Opiliones). **Behavioural Processes**, v. 109, 2-13.
- Chelini MC, Willemart RH, Hebets E. 2009 Costs and benefits of freezing behaviour in the harvestman *Eumesosoma roeweri* (Arachnida, Opiliones). **Behavioural Processes**, v. 82, 153-159.
- Costa TM, Silva NFS, Willemart RH. 2016a Prey capture behavior in three Neotropical armored harvestmen (Arachnida, Opiliones). **Journal of Ethology**, v. 34, 183-190.
- Costa TM, Hebets EA, Melo D, Willemart RH. 2016b Costly learning: preference for familiar food persists despite negative impact on survival. **Biology Letters**, v. 12, 1-4.
- Costa TM, Willemart, RH. 2013 First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. **Zoologia**, v. 30, 359-361.
- Curtis DJ, Machado G. 2007 Ecology, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), Harvestmen: **The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, pp. 280-308.
- Darwin, C. 1871. **The Descent of Man and Selection in Relation to Sex**. John Murray, London.
- DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R. 2010 Systematic review and cladistics analysis of the Hernandariinae (Opiliones: Gonyleptidae). **Zoologia**, v. 27, 577-642.

- Donaldson ZR, Grether GF. 2007 Tradition without social learning: scent-mark-based communal roost formation in a Neotropical harvestman (*Prionostemma* sp.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, 801-809.
- Fernandes NS, Willemart RH. 2014 Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. **Comptes Rendus Biologie**, v. 337, 269-275.
- Giribet G, Prieto CE. 2003 A new afrotropical *Ogovea* (Opiliones, Cyphophthalmi) from Cameroon, with a discussion on the taxonomic characters in the family Ogoveidae. **Zootaxa**, v. 329, 1-18.
- Giribet G, Sharma PP, Benavides LR, Boyer SL, Clouse RM, De Bivort BL, Dimitrov D, Kawauchi GY, Muriene J, Schwendinger PJ. 2012 Evolutionary and biogeographical history of an ancient and global group of arachnids (Arachnida: Opiliones: Cyphophthalmi) with a new taxonomic arrangement. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 105, 92-130.
- Gnaspini P, Hara MR. 2007 Defense Mechanisms, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), Harvestmen: **The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 374-399.
- Grether GF, Donaldson ZR. 2007 Communal roost site selection in a neotropical harvestman: habitat limitation vs. tradition. **Ethology**, v. 113, 290-300.
- Hara MR, Gnaspini P. 2003 Comparative study of the defensive behavior and morphology of the gland opening area among harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae) under a phylogenetic perspective. **Arthropod Structure & Development**, v. 32, 257-275.
- Hoenen S, Gnaspini P. 1999 Activity rhythms and behavioral characterization of two epigean and one cavernicolous harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). **Journal of Arachnology**, v. 27, 159-164.
- Kury AB. 2013 Order Opiliones Sundevall, 1833. **Zootaxa**, v. 3703, 27-33.

- Kury AB. 2017 Classification of Opiliones. Disponível em: <<http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>>. Acesso em 04 de set. 2017.
- Kury AB, Mendes AC, Souza DR. 2014 World checklist of Opiliones species (Arachnida). Part 1: Laniatores – Travunioidea and Triaenonychoidea, **Biodiversity Data Journal** 2, e4094:1-17.
- Kury AB, Pinto-da-Rocha R. 2007 Taxonomy: Gonyleptidae, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), **Harvestmen: The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, pp. 196-203.
- Machado G, Bonato V, Oliveira PS. 2002 Alarm communication: a new function for the scent- gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). **Naturwissenschaften**, v. 89, 357-60.
- Macias-Ordóñez R, Machado G, Pèrez-González A, Shultz JW. 2010 Genitalic evolution in Opiliones, in: Leonard JL, Córdoba-Aguilar A. **The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals**. Oxford University Press, pp. 285-306.
- Martens J. 1969 Die Abgrenzung von Biospezies auf biologisch-ethologischer und morphologischer Grundlage am Beispiel der Gattung *Ischyropsalis* C.L. Koch 1839 (Opiliones: Ischyropsalididae). **Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere**, v. 96, 133-264.
- Martens J. 1973 Feinstruktur der cheliceren-drüsen von *Nemastoma dentigerum* Canestrini (Opiliones: Nemastomatidae). **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 136, 121-137.
- Martens J, Schawaller W. 1977 Die Cheliceren-Drüsen der Weberknechtene chrastreroptischen und lichtoptischen Befunden (Arachnida: Opiliones). **Zoomorphologie**, v. 86, 223-250.
- Murayama GP, Willemart RH. 2015 Mode of use of sexually dimorphic glands in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. **Journal of Natural History**, v. 49, 1-11.

- Pabst W. 1953 Zur Biologie der mitteleuropäischen Troguliden. **Zoologisches Jahrbuch, Abteilung Fuer Systematik**, v. 82, 1-156.
- Pinto-da-Rocha R, Giribet G. 2007 Taxonomy, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), Harvestmen: **The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, pp. 88-246.
- Proud DN, Felgenhauer EF. 2011 Ultrastructure of the sexually dimorphic basitarsal glands of leg I in Manaosbiid harvestmen (Opiliones, Laniatores). **Journal of Morphology**, v. 272, 872-882.
- Proud DN, Felgenhauer EF. 2013 Ultrastructure of the sexually dimorphic tarsal glands and tegumental glands in gonyleptoid harvestmen (Opiliones, Laniatores). **Journal of Morphology**, v. 274, 1203-1215.
- Rodriguez AL, Townsend Jr VR. 2015 Survey of cuticular structures on leg IV of cosmetid harvestmen (Opiliones: Laniatores: Gonyleptoidea). **Journal of Arachnology**, v. 43, 194-206.
- Santos GC, Hogan JA, Willemart RH. 2013 Associative learning in harvestman (Arachnida, Opiliones). **Behavioural Processes**, v. 100, 64-66.
- Sharma PP, Kaluziak ST, Pérez-Porro AR, González VL, Hormiga G, Wheeler WC, Giribet G. 2014 Phylogenomic interrogation of Arachnida reveals systemic conflicts in phylogenetic signal. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, 2963-2984.
- Segovia JMG, Del-Claro K, Willemart RH. 2015 Defences of a Neotropical harvestman against different levels of threat by the recluse spider. **Behaviour**, v. 152, p. 757-773.
- Shultz JW. 2005 Preliminary analysis of mating in *Leiobunum nigripes* (Opiliones) and diversification of male reproductive structure in *Leiobunum*. **News American Arachnology Society**, v. 72, 11.
- Shultz JW, Pinto-da-Rocha R. 2007, in: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. (Eds.), Harvestmen: **The Biology of Opiliones**. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, pp. 14-18.

- Souza ES, Willemart RH. 2011 Harvest-ironman: heavy armature, and not its defensive secretions, protects a harvestman against a spider. **Animal Behaviour**, v. 81, p. 127-133.
- Teng B, Dao S, Donaldson ZR, Grether GF. 2012 New communal roosting tradition established through experimental translocation in a Neotropical harvestman. **Animal Behaviour**, v. 84, 1183-1190.
- Townsend VRJr, Viquez C, VanZandt PA, Proud DN. 2010 Key to the species of Cosmetidae (Arachnida, Opiliones) of Central America, with notes on penis morphology and sexual dimorphisms. **Zootaxa**, v. 2414, 1–26.
- Willemart RH, Chelini MC. 2007 Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 123, 73-79.
- Willemart RH, Chelini MC, de Andrade R, Gnaspini P. 2007 An ethological approach to a SEM survey on sensory structures and tegumental gland openings of two neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). **Italian Journal of Zoology**, v. 74, 39-54.
- Willemart RH, Farine JP, Peretti AV, Gnaspini P. 2006 Behavioral roles of the sexually dimorphic structures in the male harvestman, *Phalangium opilio* (Opiliones, Phalangidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, 1763-1744.
- Willemart RH, Farine JP, Gnaspini P. 2009 Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. **Acta Zoologica**, v. 90, 209-227.
- Willemart RH, Giribet G. 2010 A scanning electron microscopic survey of the cuticle in Cyphophthalmi (Arachnida, Opiliones) with the description of novel sensory and glandular structures. **Zoomorphology**, v. 129, 175-183.
- Willemart RH, Hebets EA. 2012 Sexual differences in the behavior of the harvestman *Leiobunum vittatum* (Opiliones, Sclerosomatidae) towards conspecific cues. **Journal of Insect Behavior**, v. 25, 12-23.

Capítulo 1: Dimorfismo sexual em aberturas glandulares das pernas de três subfamílias de Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Thaiany Miranda Costa ^{1,2} Alípio Rezende Benedetti ², Rodrigo Hirata Willemart ^{1,2,3}

¹ Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, Rua Arlindo Bértio, 1000, Ermelino Matarazo, São Paulo, SP 03828-000, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 321, Travessa 14, São Paulo, SP 05508-090, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Rua Professor Artur Riedel, 275, Jardim Eldorado, Diadema, SP 09972-270, Brasil.

Autor para correspondência: Rodrigo Hirata Willemart (E-mail: willemart@usp.br)

Resumo: Glândulas sexualmente dimórficas podem não apenas ser informativas taxonomicamente como podem ainda trazer informações importantes sobre a comunicação entre os sexos. Nesse trabalho estudamos a evolução de aberturas glandulares sexualmente dimórficas nas pernas I (basitarso) e pernas IV (presença/ausência de intumescimento e quantidade de poros no metatarso) em uma linhagem monofilética pertencente ao clado K92 composta pelas subfamílias Progonyleptoidellinae, Sodreaninae e parte de Gonyleptinae. Utilizamos Microscopia Eletrônica de Varredura para descrever as aberturas glandulares e compará-las entre exemplares das três subfamílias analisadas. Encontramos aberturas glandulares sexualmente dimórficas na perna I de uma espécie em Progonyleptoidellinae (de seis analisadas), de uma espécie de Gonyleptinae (de quatro analisadas) e em três espécies de Sodreaninae (de seis analisadas). Com relação às aberturas da perna IV, todos os machos estudados possuem maiores quantidades de poros na perna IV do que as fêmeas exceto uma espécie de Gonyleptinae e uma de Sodreaninae. Os machos de todas as espécies estudadas possuem o astrágalo das pernas IV intumescidos, exceto uma espécie em Progonyleptoidellinae. Portanto as aberturas glandulares sexualmente dimórficas na perna I nos machos mostram-se variáveis na linhagem interna ao clado K92 estudada

nesse trabalho. Por outro lado, o intumescimento e quantidade de poros na perna IV dos machos parecem ser conservados na linhagem estudada.

Abstract: Sexually dimorphic glands may not only be taxonomically informative but can also bring important information about communication between the sexes. In this work we studied the evolution of sexually dimorphic glandular openings on legs I (basitarsus) and legs IV (presence/absence of swollen area and quantity of pores on metatarsus) in a monophyletic lineage belonging to clade K92 that include the subfamilies Progonyleptoidellinae, Sodreaninae and part of Gonyleptinae. We used Scanning Electron Microscopy to describe the glandular openings and compare them among specimens of the three subfamilies analyzed. We found sexually dimorphic glandular openings on legs I of one species in Progonyleptoidellinae (out of six analyzed), one specie of Gonyleptinae (out of four analyzed) and three species of Sodreaninae (out of six analyzed). Concerning glandular openings on legs IV, all males studied have more pores than females except for one species in Gonyleptinae and another in Sodreaninae. Males of all species studied have a swollen astragalus IV, except for one species in Progonyleptoidellinae. Therefore, the glandular openings in leg I in males are shown to be variable for the internal lineage to the Clade K92 studied in this work. On the other hand, the swollen area and the greater quantity of pores on legs IV of males seem to be conserved in the lineage studied.

Palavras chave: Progonyleptoidellinae, Gonyleptinae, Sodreaninae, basitarso, metatarso, K92.

1. Introdução

Diferenças sexuais secundárias em animais como coloração, tamanho corporal e ornamentação têm sido extensivamente estudados durante as últimas décadas (Andersson 1994, Fairbairn et al 2007). Uma importante característica sexual secundária que tem recebido menos atenção são as glândulas sexualmente dimórficas, que liberam secreções para o exterior do corpo. Essas secreções possuem um papel primordial no comportamento de acasalamento e demarcação territorial em muitos artrópodes (Vahed 1998, Greenfield 2002, Vahed 2007, Schulz 2013).

Outras funções sexuais foram descritas para as glândulas dos artrópodes, como facilitação do acoplamento dos órgãos reprodutores e auxílio para maximizar a transferência de espermatozóides (Harris e Foster 1995, Wyatt 2014). As secreções liberadas assim como o comportamento que podem desencadear têm sido estudados principalmente entre os insetos (Percy-Cunningham e Macdonald 1987, Harris e Foster 1995, Greenfield 2002) mas também entre os aracnídeos como ácaros (Kuwara 2004), escorpiões (Polis e Sissom 1990) e aranhas (Gaskett 2007, Michalik e Uhl 2011). Um grupo de aracnídeo especialmente interessante para o estudo de comunicação química sexual é o dos Opiliones. Há evidências morfológicas de glândulas sexualmente dimórficas para as quatro subordens (Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi e Laniatores) e provavelmente associadas à comunicação sexual, uma vez que estão presentes em apenas um dos sexos (Giribet e Prieto 2003, Macías-Ordóñez et al 2010, Willemart et al 2010). Em Cyphophthalmi, os machos possuem glândulas tarsais nas pernas IV e nas regiões anal e esternal. Porém, as funções destas glândulas são desconhecidas até o momento (Willemart e Giribet 2010). Apenas os machos de algumas espécies das subordens Dyspnoi possuem glândulas nas quelíceras, enquanto que em Eupnoi as glândulas sexualmente dimórficas são encontradas no pênis e em ambos os casos são utilizadas no acasalamento (Martens 1969, Martens 1973, Martens e Schawaller 1977, Shultz 2005, Willemart et al 2006, Macías-Ordóñez et al 2010, Burns et al 2013).

Apesar de Laniatores possuir a maior diversidade de espécies descritas, apenas recentemente a morfologia externa de glândulas sexualmente dimórficas para representantes da subordem foi investigada (Willemart et al 2007, Willemart et al 2010, Fernandes e Willemart 2014). Além disso, Pinto-da-Rocha e Bragagnolo (2010) apontam o caráter intumescimento para perna IV de machos como sinapomórfico para um clado composto por Caelopyginae, Sodreaninae e Progonyleptoidellinae. Tal característica muitas vezes reflete a presença de glândulas (Willemart et al 2010). Entretanto, Progonyleptoidellinae tem sido recuperado como parafilético ou polifilético nos recentes trabalhos filogenéticos para o grupo (Pinto-da-Rocha e Bragagnolo 2010, Pinto-da-Rocha et al 2014), o que tem trazido dúvidas sobre a evolução dos caracteres de dimorfismo sexual nas pernas I (presença/ausência de aberturas glandulares) e IV (quantidade de poros e presença/ausência de intumescimento) levantados por Willemart et al (2010) e Pinto-da-Rocha e Bragagnolo (2010) para a subfamília. Apesar do trabalho filogenético de Pinto-da-Rocha et al (2014) recuperar diversas subfamílias em

Gonyleptidae em parafilia ou mesmos em polifilia, os autores recuperam como monofilético o clado K92 (sensu Caetano e Machado 2013, Pinto-da-Rocha et al 2014), assim como uma linhagem interna a esse clado composta por Progonyleptoidellinae, Sodreaninae e parte de Gonyleptinae. Porém, até o momento, não há informações acerca da morfologia das aberturas glandulares na perna I para representantes de Sodreaninae e Gonyleptinae pertencentes a essa linhagem interna do clado K92.

Desse modo, para melhor entendermos a evolução de glândulas sexuais em opiliões, estudamos as aberturas glandulares sexualmente dimórficas nas pernas I (basitarso) e intumescimento e quantidade de poros na perna IV (metatarso) na linhagem monofilética dentro do clado K92 composta pelas subfamílias Progonyleptoidellinae, Sodreaninae e parte de Gonyleptinae (Pinto-da-Rocha et al 2014).

2. Material e Métodos

2.1 Animais examinados

Examinamos exemplares de opiliões depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, Brasil, representantes adultos de três subfamílias em Gonyleptidae: Progonyleptoidellinae, Gonyleptinae e Sodreaninae. A lista de espécies e *voucher* podem ser encontrados na Tabela 1.

2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Utilizamos um macho e uma fêmea adultos para cada espécie analisada. Por meio de microscopia eletrônica de varredura analisamos as regiões dorsal, ventral, pro e retrolateral do basitarso da perna I (Figura 1) e metatarso da perna IV na região do astrágalo (Figura 2). Essas partes foram dissecadas e em seguida passaram por quatro etapas de limpeza no ultrassom, com duração de seis minutos cada: (1) em água destilada, (2) em 10:1 com água destilada e detergente, (3 e 4) com água destilada para reforçar a retirada do detergente das partes dissecadas. Em seguida, secamos as pernas com papel toalha e as colamos com fita adesiva em stubs de alumínio. Os stubs foram mantidos em uma estufa a 40° C por no mínimo 24h e banhados com ouro (Sputter Coater Balzer SCD 50) para fotografarmos com o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 e Sigma VP Carl Zeiss).

2.3 Medidas das aberturas no tarso I e do metatarso IV

Medimos o diâmetro das aberturas no tarso I, como mostrado na figura 3C e também a espessura da região proximal do astrágalo (parte basal do metatarso) (Figura 4A) da perna IV de machos e fêmeas de todas as espécies. Para isso, utilizamos o mesmo aumento para tirar as fotos das mesmas regiões entre os sexos. As medidas das aberturas glandulares do tarso e da espessura do metatarso podem não ser exatamente precisas em alguns casos devido ao ângulo das fotos. O tarso dos opiliões estudados aqui é dividido em distitarso e basitarso (Figura 1). A parte do basitarso possui três ou quatro tarsômeros dependendo da espécie e começamos a contá-los a partir do tarsômero mais distal.

2.4 Árvore de Gonyleptidae baseada em morfologia externa de aberturas glandulares

Para a otimização dos caracteres morfológicos de aberturas glandulares nas pernas I e IV e intumescimento e quantidade de poros na perna IV (Willemart et al 2010; este trabalho) utilizamos as filogenias disponíveis de Gonyleptidae baseado em dados moleculares: Progonyleptoidellinae e parte de Gonyleptinae (Pinto-da-Rocha et al 2014) e para Sodreaninae baseadas em dados morfológicos (Pinto-da-Rocha e Bragagnolo 2010). Primeiramente, sintetizamos uma nova árvore juntando as informações dos dois trabalhos filogenéticos acima citados, utilizando o programa FigTree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). Utilizamos apenas a parte das filogenias que continha a linhagem composta por Progonyleptoidellinae, parte de Gonyleptinae e Sodreaninae (Figura 5), pertencentes ao clado K92 de Pinto-da-Rocha et al (2014). Não incluímos Caelopyginae de Pinto-da-Rocha e Bragagnolo (2010) nas análises, por não fazer parte da linhagem interna ao clado K92 de Pinto-da-Rocha et al (2014).

Sintetizamos ainda outra árvore adicionando as espécies que foram aqui investigadas, mas que não foram incluídas nos trabalhos filogenéticos de Pinto-da-Rocha et al (2014) (Figura 6). Nesse caso, apesar de não se conhecer ao certo a posição filogenética dessas espécies, elas foram tentativamente adicionadas à filogenia baseando-se no seu status taxonômico, ou seja, gêneros iguais foram colocados juntos. Os gêneros descritos em Progonyleptoidellinae que não tinham sido adicionados à filogenia foram deixados em politomia dentro da subfamília (Figura 6).

3. Resultados

3.1 Morfologia externa das aberturas glandulares no basitarso da perna I

As aberturas do tarso da perna I são grandes e dentro há pequenos poros (Figuras 3, 7-10; medidas abaixo). A região da abertura é facilmente distinguida porque é caracterizada por uma depressão rasa na cutícula com poros aglomerados e uma borda grossa delimitando cada um dos poros. Para todas as espécies estudadas, não há cerdas e nem diferença na textura da cutícula ao redor das aberturas (Figuras 1-6). O tamanho e a forma das aberturas variam entre as espécies e também entre os tarsômeros do mesmo indivíduo, como mostrado abaixo.

3.1.1 Progonyleptoidellinae

Dentre os machos e fêmeas de seis espécies da subfamília Progonyleptoidellinae (veja Tabela 1), encontramos aberturas glandulares somente em macho de *Cadeadoius niger*. A espécie possui quatro tarsômeros na região do basitarso I. Encontramos aberturas no 3º tarsômero na região retrolateral (Figura 3A e B). No 4º tarsômero, encontramos tanto na região retro quanto prolateral (Figuras 3C-E). Em cada uma dessas regiões encontramos somente uma abertura.

A abertura do 3º tarsômero de *C. niger* possui 10,3 µm (Figura 3A), do 4º tarsômero na região retrolateral tem 31,1 µm de diâmetro (Figura 3C) e da região prolateral 18,2 µm de diâmetro (Figura 3E).

3.1.2 Gonyleptinae

Das quatro espécies analisadas de Gonyleptinae (Tabela 1), encontramos aberturas somente nos machos de *Holoversia nigra*, (Figura 7). Essa espécie possui três tarsômeros no basitarso I. Os machos possuem aberturas no 2º (Figuras 7A e C) e no 3º tarsômero (Figuras 7E e F) nas regiões retro e prolaterais. Em todas as regiões, exceto no 3º tarsômero prolateral, há somente uma abertura, enquanto que 3º tarsômero prolateral há duas aberturas (Figura 7F).

Em *H. nigra* as aberturas no 2º tarsômero possuem 19,25 µm e 9,74 µm de diâmetro nas regiões retro e prolateral, respectivamente (Figuras 7A e C). No 3º tarsômero as aberturas possuem 29,7 µm de diâmetro (retrolateral) e na região prolateral

a abertura que está no lado esquerdo da foto tem 12,6 µm de diâmetro e a do lado direito possui 10,15 µm de diâmetro (Figura 7F). Adicionalmente, o macho possui os tarsômeros intumescidos em relação às fêmeas, tanto no 2º quanto no 3º tarsômero (que são os tarsômeros com as aberturas) (Figura 7).

3.1.3 Sodreaninae

Das seis espécies de Sodreaninae investigadas (Tabela 1), encontramos aberturas em *Sodreana barbiellinii*, *S. leprevosti* e *S. hatschibachi* (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). *Sodreana barbiellinii* possui quatro tarsômeros no basitarso I. A fêmea possui aberturas no 2º tarsômero na região prolateral. O macho possui aberturas no 2º e no 3º tarsômero pro e retrolateral (Figura 8). *Sodreana leprevosti* possui três tarsômeros no basitarso I. Encontramos aberturas na região prolateral no 3º tarsômero somente em machos (Figura 9). *Sodreana hatschibachi* possui três tarsômeros no basitarso. Encontramos na região prolateral do 3º tarsômero uma abertura, somente no macho (Figura 10). Há somente uma abertura em cada tarsômero, exceto para *S. hatschibachi* (Figura 10).

A abertura da fêmea de *S. barbiellinii*, situada no 2º tarsômero prolateral, possui 6,9 µm de diâmetro (Figura 8B). Nessa mesma região, a abertura do macho possui 12,5 µm de diâmetro (Figura 8A). Neste mesmo tarsômero, na região retrolateral do macho, a abertura possui 16,5 µm de diâmetro (Figura 8C). No 3º tarsômero prolateral a abertura possui 5,45 µm de diâmetro (Figura 8E) e na região retrolateral 6,34 µm de diâmetro (Figura 8G). A abertura do 3º tarsômero prolateral de *S. leprevosti*, possui 4,93 µm de diâmetro (Figura 9A). A abertura do 3º tarsômero prolateral de *S. hatschibachi* do lado esquerdo da figura 10B, possui 10,15 µm de diâmetro e a do lado direito da mesma figura possui 12,45 µm de diâmetro (Figura 10B-D).

3.2 Morfologia externa glandular no metatarso da perna IV

Os poros do metatarso na região do astrágalo da perna IV são poros individuais e difusos. Na maioria das espécies estudadas, os machos possuem o metatarso IV intumescido. As medidas das pernas de ambos os sexos, para todas as espécies estudadas, estão sintetizadas na Tabela 2. Algumas espécies possuem uma diferença muito grande de tamanho entre os sexos (ver Figura 4). Há algumas exceções em relação a esses intumescimentos que estão detalhadas abaixo.

3.2.1 Progonyleptoidellinae

Todos os machos estudados de Progonyleptoidellinae possuem a espessura do metatarso IV intumescido em relação às fêmeas (ver Tabela 2), com exceção de *Leptocnema sulphurea* (em que o metatarso IV de machos e fêmeas possui a mesma espessura). Os machos possuem mais poros do que as fêmeas em todas as espécies analisadas (Figura 11 e 12).

3.2.2 Gonyleptinae

Das quatro espécies analisadas de Gonyleptinae, somente *Neosadocus variabilis* possui a espessura do metatarso IV igual em macho e fêmea (ver Tabela 2). Em relação à quantidade de poros, apenas em *Holoversia nigra* parece haver uma quantidade similar para ambos os sexos (Figura 13). Nas outras espécies, machos possuem mais poros e metatarso IV mais espesso do que o das fêmeas.

3.2.3 Sodreaninae

Em todas as espécies de Sodreaninae analisadas, os machos possuem o metatarso IV intumescido (ver Tabela 2). Não encontramos poros nos dois sexos em *Sodreana barbiellinii* (ver Figura 14A-B). Não parece haver diferença entre os sexos na quantidade de poros em *S. glaucoi* (ver Figura 14C-D). Nas outras espécies, os machos possuem mais poros do que as fêmeas (Figura 14E-F e 15A-F).

3.3 Árvore de Gonyleptidae baseado em morfologia externa das glândulas

Otimizamos na árvore de Gonyleptidae os caracteres obtidos nesse trabalho (para todas as espécies) e os obtidos por Willemart et al (2010) (para as espécies de Progonyleptoidellinae) referentes às aberturas no basitarso I e às diferenças na quantidade de poros das aberturas glandulares no metatarso IV entre os sexos (Figuras 5 e 6).

Para a primeira árvore (com as espécies presentes na hipótese de Pinto-da-Rocha e Bragagnolo 2010 e Pinto-da-Rocha et al. 2014, ver Material e Métodos) todos os machos das espécies de Progonyleptoidellinae possuem aberturas na perna I e maior quantidade de poros na perna IV do que as das fêmeas, (dados obtidos por Willemart et al 2010) (Figura 5). Para Sodreaninae, os machos das espécies irmãs *Sodreana*

hatschbachi e *S. leprevosti* possuem abertura glandular na perna I e maior quantidade de poros na perna IV do que as fêmeas (Figura 5). Já o agrupamento recuperado como monofilético composto pelas espécies *Sodreana glaucoi*, *S. sodreana* e *S. granulata* não possui abertura na perna I. Machos possuem mais poros no metatarso da perna IV do que fêmeas, exceto em *S. glaucoi*, em que não há dimorfismo evidente no número de poros entre machos e fêmeas na perna IV. Em posição basal dentre os Sodreaninae, *S. barbiellinii* apresenta abertura na perna I e ausência de poros na perna IV em ambos os sexos (Figura 5).

Para a segunda árvore (com adição das espécies não testadas filogeneticamente por Pinto da Rocha et al 2014, ver Material e Métodos) o caráter abertura glandular na perna I nos machos se mostra variável para a subfamília Progonyleptoidellinae (dados obtidos por meio desse trabalho) (Figura 6). *Progonyleptoidellus orguensis* e *P. fuscipictus* não possuem aberturas na perna I, diferente de *Progonyleptoidellus striatus*, porém os machos dessas três espécies possuem quantidades maiores de poros na perna IV do que as fêmeas (Figura 6). Macho de *Cadeadoius niger* possui glândula na perna I e maior quantidade de poros na perna IV (Figura 6). As outras espécies de Progonyleptoidellinae: *Moreiranula moreirae*, *M. mamillata* e *Leptocnema sulphurea* não possuem aberturas na perna I, mas os machos possuem maiores quantidades de poros na perna IV (Figura 6).

Já para os Gonyleptinae, as três espécies analisadas do gênero *Neosadocus* não possuem aberturas na perna I e os machos possuem maior quantidade de poros na perna IV do que as fêmeas, diferente de *Holoveria nigra* que apesar de pertencer a Gonyleptinae possui aberturas na perna I e não possui diferença na quantidade de poros na perna IV entre os sexos (Figura 6).

4. Discussão

A morfologia externa referente a aberturas na perna I mostra-se variável nas três subfamílias aqui analisadas e a otimização desse caráter na filogenia dos Gonyleptidae sugere que ele não seja conservado evolutivamente, estando presente e ausente nas três subfamílias dependendo da espécie. Já para os poros no metatarso da perna IV, a morfologia é a mesma em ambos os sexos, porém na maioria das espécies os machos

possuem mais poros do que as fêmeas e os machos possuem intumescimento dessa parte.

As aberturas no metatarso e no basitarso da perna I se apresentam sempre como grupos de poros (Figuras 3, 7, 9 e 10) diferente da condição presente na perna IV, que são sempre poros isolados e dispersos (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15) (Willemart et al 2010, este trabalho). Estes dados corroboram o encontrado por Willemart et al (2010) e Fernandes & Willemart (2014), sugerindo um padrão nas espécies em que essas aberturas glandulares ocorrem. Entretanto, contrastando com Willemart et al (2010), encontramos variação interespecífica com relação à presença de aberturas na perna I em machos, estando ausente em algumas espécies; e também encontramos variação com relação ao intumescimento na perna IV em machos.

Os resultados de morfologia externa que obtivemos referente à presença ou ausência das aberturas glandulares na perna I não sustentam esse caráter como sinapomórfico para Progonyleptoidellinae, Gonyleptinae (em parte) e Sodreaninae uma vez que ambos os estados (ausente/presente) ocorrem nas subfamílias, inclusive no mesmo gênero no caso de Progonyleptoidellinae (e.g. *Progonyleptoidellus*) (Figura 6). Tal resultado aponta para três possibilidades: convergência, e nesse caso aberturas surgiram diversas vezes ao longo da história evolutiva dessa subfamília; perda, com um ancestral comum possuindo aberturas na perna I e diversas linhagens perdendo essas aberturas; um equívoco taxonômico no reconhecimento de linhagens monofiléticas.

Baseados em dados moleculares para suas análises filogenéticas, Pinto da Rocha et al (2014) recuperaram Progonyleptoidellinae como polifilético com relação à Gonyleptinae (em partes), apesar da baixa amostragem para Progonyleptoidellinae (cinco espécies sequenciadas). Inclusive, Pinto-da-Rocha e Bragagnolo (2010) já haviam mostrado que *Progonyleptoidellus orguensis* não se agrupava com as outras espécies do gênero em um trabalho filogenético baseado em dados morfológicos. Pinto da Rocha et al (2014) ainda comentam que *P. orguensis* foi alocado ao gênero sem embasamento sistemático e taxonômico, não apresentando as características sinapomórficas necessárias encontradas na subfamília. Nós também recuperamos variação dentro de *Progonyleptoidellus*, com *P. orguensis* e *P. fuscipictus* não apresentando aberturas glandulares na perna I, sendo que esse caráter está presente nos machos de *P. striatus*. Esses dados em conjunto sugerem que tanto taxonomicamente

como as relações filogenéticas em Progonyleptoidellinae ainda são incertas, dificultando qualquer avaliação evolutiva de caracteres morfológicos para a subfamília.

Os dados filogenéticos de Pinto da Rocha et al (2014) ainda recuperam a parafilía de Gonyleptinae (em partes) com relação a Progonyleptoidellinae. Nossos dados de morfologia externa suportam esses dados: machos de *Holoversia nigra* possuem glândulas na perna I (Figura 7) e quantidades similares de poros na perna IV entre os sexos (Figura 13). Para as três espécies de *Neosadocus* analisadas essas características são exatamente opostas, as espécies do gênero não possuem glândulas na perna I e os machos possuem mais poros na perna IV do que as fêmeas (Figura 13).

Com relação ao clado K92, Pinto-da-Rocha et al (2014) o recupera como monofilético assim como uma linhagem interna envolvendo as espécies de Progonyleptoidellinae + Gonyleptinae (parte). Essa linhagem é sustentada em nossas análises com relação à quantidade de poros no metatarso da perna IV, com os machos apresentando mais poros que as fêmeas e intumescimento na perna (Figura 6) (exceto em *Leptocnema suphurea*). *Holoversia nigra* é a exceção nesse agrupamento, uma vez que machos e fêmeas possuem quantidade similar de poros (Figura 13), possivelmente uma mudança evolutiva para essa espécie ou para a linhagem Progonyleptoidellinae + Gonyleptinae (parte).

Uma linhagem mais ampla dentro do clado K92 envolvendo Progonyleptoidellinae, Gonyleptinae (parte) e Sodreaninae, também recuperada como monofilética por Pinto-da-Rocha et al (2014), apresenta nas nossas análises machos com intumescimento e quantidade de poros que fêmeas na perna IV (com poucas exceções), possivelmente uma característica conservada nessa linhagem. Este resultado sustenta os Pinto-da-Rocha e Bragagnolo (2010) que apontara o caráter de intumescimento na perna IV dos machos como sinapomórfico para a linhagem composta por Progonyleptoidellinae + Sodreaninae + Caelopyginae, apesar de regressão do estado desse caráter para *Iguapeia melanocephala* e *Mitopernoides variabilis*.

Já com relação à subfamília Sodreaninae, ela tem sido recuperada como monofilética pelas análises moleculares e de morfologia externa (Pinto-da-Rocha e Bragagnolo 2010, Pinto-da-Rocha et al 2014). A presença/ausência de aberturas glandulares na perna I nos machos é variável nas espécies analisadas aqui. Entretanto, o

clado com as espécies *S. sodreana*, *S. granulata* e *S. glaucoi* foi recuperado como monofilético nas análises filogenéticas (Pinto-da-Rocha & Bragagnolo 2010) e não apresenta aberturas na perna I, enquanto os machos das outras espécies analisadas da subfamília possuem (Figura 8, 9 e 10). Ainda é especulativo, mas esse caráter pode estar presente para toda subfamília e ter sido perdido apenas por essas três espécies.

Apesar de alguns trabalhos comportamentais com Laniatores mostrarem o uso de glândulas dimórficas sexuais, não sabemos ainda a função dessas glândulas. *Iporangaia pustulosa* (Progonyleptoidellinae) deixa químicos pelo ambiente com o metatarso IV (Murayama e Willemart 2015). *Gryne perlata* e *G. coccineloides* (Cosmetidae) raspam os metatarsos I e IV tanto no substrato, quanto no seu próprio corpo (Fernandes e Willemart 2014). As glândulas desses animais são, ao menos externamente, similares às glândulas encontradas nesse trabalho. Os machos podem deixar químicos pelo ambiente para atrair fêmeas e/ou marcar territórios. A atração do sexo oposto por meio de glândulas sexualmente dimórficas é comum em insetos e aracnídeos (Vahed 1988, Melville et al 2003, Sonenshine 2006, Sreng 2006, Ruther et al 2011, Wen et al 2015). Podem ainda liberar químicos no cortejo (Macías-Ordóñez et al 2010) e, neste caso, seriam voláteis já que, ao menos em *Gryne*, não há contato entre as glândulas e a fêmea durante o acasalamento (Dias e Willemart 2016). O uso de voláteis seria possível já que há receptores olfativos em todas as principais linhagens de Laniatores (Gainett et al 2017).

As quatro espécies de Progonyleptoidellinae sobre as quais se tem informação possuem as glândulas nas pernas I e II e possuem cuidado paternal: *Cadeadoius niger*, *Iporangaia pustulosa*, *Progonyleptoidellus striatus* e *Iguapeia melanocephala* (Stefanini-Jim et al 1987, Machado et al 2004, Willemart et al 2010, Caetano e Machado 2013), sugerindo uma possível relação. Entretanto, há espécies com cuidado paternal sem as glândulas (Mora 1990, Machado et al 2004, Pinto-da-Rocha e Bragagnolo 2017) e espécies com as glândulas sem cuidado paternal (Fernandes e Willemart 2014). Estudos comportamentais poderão esclarecer a função destas glândulas.

Este estudo nos permitiu ter uma visão mais abrangente de como se apresentam as glândulas sexualmente dimórficas em três subfamílias de Gonyleptidae. As glândulas sexualmente dimórficas na perna I estão presentes em poucas espécies, diferentemente

do que ocorre para as glândulas da perna IV que aparecem na maioria das espécies estudadas. Além disso, a presença de glândulas na perna I não mostra relação de monofilia entre e dentro das subfamílias. Por outro lado, o dimorfismo sexual da perna IV aparentemente é conservado nas três subfamílias analisadas. Esperamos ter contribuído ainda para a sistemática do grupo, trazendo mais aberturas glandulares que podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos (Gainett et al 2014). Finalmente, os dados apresentados também poderão contribuir para trabalhos comportamentais, uma vez que esses animais possivelmente utilizem essas glândulas sexualmente.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Francisco Dal Vechio e aos membros do LESCA: Jéssica Dias, Guilherme Gainett, Gabriel Murayama, Guilherme Pagoti e Júlio Segovia pela revisão do trabalho. Ao João Fadil, Guilherme Gainett e Marília Pessoa, pela busca de espécimes no campo. Ao Prof. Dr. Ricardo Pinto-da-Rocha e o técnico Mauro do MZUSP pela assistência para eu retirar os animais do Museu. À assistência sempre gentil, na microscopia eletrônica de varredura, dos técnicos do Departamento de Zoologia da USP Ênio Mattos e Phillip Lenktaitis. À CAPES processo 133536/2016-5 (para TMC) e à FAPESP processo 2015/01518-8 (para RHW) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Andersson, M. 1994 **Sexual Selection**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Burns MM, Hedin M, Shultz JW. 2013 Comparative analyses of reproductive structures in Harvestmen (Opiliones) reveal multiple transitions from courtship to precopulatory antagonism. **Plos One**, v. 8, e66767
- Caetano DS, Machado G. 2013 The ecological tale of Gonyleptidae (Arachnida, Opiliones) evolution: phylogeny of a Neotropical lineage of armoured harvestmen using ecological, behavioural and chemical characters. **Cladistics**, v. 29, 589-609.
- Dias JM, Willemart RH. 2016 Do sexually dimorphic glands in the harvestman *Gryne perlata* (Arachnida, Opiliones) release contact pheromones during mating? **European Journal of Entomology**, v. 113, 184-191.

- Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T. 2007 **Sex, size and gender roles. Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism**. Oxford: Oxford University Press.
- Fernandes NS, Willemart RH. 2014 Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. **Comptes Rendus Biologie**, v. 337, 269-275.
- Gainett G, Michalik P, Müller CHG, Giribet G, Talarico G, Willemart RH, 2017 Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). **Arthropod Structure & Development**, v. 46, 178-195.
- Gaskett AC. 2007 Spiders sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. **Biological Reviews**, v. 82, 27-48.
- Giribet G, Prieto CE. 2003 A new Afrotropical Ogovea (Opiliones, Cyphophthalmi) from Cameroon, with a discussion on the taxonomic characters in the family Ogoveidae. **Zootaxa**, v. 329, 1-18.
- Greenfield MD. 2002 **Signalers and Receivers**. Oxford: Oxford University Press.
- Harris MO, Foster SP. 1995 Behavior and Integration. In: Cardé RT, Bell WJ. **Chemical ecology of Insects 2**. New York: Chapman & Hall.
- Kuwahara Y. 2004 Chemical ecology of astigmatid mites. In: Cardé RT, Miller JG, editors. **Advances in Insect Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Macías-Ordóñez R, Machado G, Pérez-González A, Shultz JW. 2010 Genitalic Evolution in Opiliones, In: Leonard JL, Córdoba-Aguilar A. **The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals**. Oxford University Press, 285-306.
- Machado G, Requena GS, Buzatto BA, Osses F, Rosseto LM. 2004 Five new cases of paternal care in harvestmen (Arachnida: Opiliones): implications for the evolution of male guarding in the Neotropical family Gonyleptidae. **Sociobiology**, v. 44, 577-598.

- Martens J. 1969 Die Abgrenzung von Biospezies auf biologisch-ethologischer und morphologischer Grundlage am Beispiel der Gattung *Ischyropsalis* C.L. Koch 1839 (Opiliones: Ischyropsalididae). **Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere**, v. 96, 133-264.
- Martens J. 1973 Feinstruktur der cheliceren-drüsen von *Nemastoma dentigerum* Canestrini (Opiliones: Nemastomatidae). **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 136, 121-137.
- Martens J, Schawaller W. 1977 Die Cheliceren-Drüsen der Weberknechtenechasteroptischen und lichtoptischen Befunden (Arachnida: Opiliones). **Zoomorphologie**, v. 86, 223-250.
- Melville JM, Tallarovic SK, Brownell PH. 2003 Evidence of Mate Trailing in the Giant Hairy Desert Scorpion, *Hadrurus arizonensis* (Scorpionida, Iuridae). **Journal of Insect Behavior**, v. 16, 97-115.
- Michalik P, Uhl G. 2011 Cephalic modifications in dimorphic dwarf spiders of the Genus *Oedothorax* (Erigoninae, Linyphiidae, Araneae) and their evolutionary implications. **Journal of Morphology**, v. 272, 814-832.
- Mora G. 1990 Paternal care in a neotropical harvestman, *Zygopachylus albomarginis* (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae). **Animal Behaviour**, v. 39, 582-593.
- Murayama GP, Willemart RH. 2015 Mode of use of sexually dimorphic glands in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. **Journal of Natural History**, v. 49, 1937-1947.
- Percy-Cunningham JE, Macdonald JA. 1987 Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Prestwich GD, Blomquist GJ. **Pheromone Biochemistry**. Orlando: Academic press.
- Pinto-da-Rocha R, Bragagnolo C. 2010 Systematic revision and cladistic analysis of the Brazilian subfamily Sodreaninae (Opiliones: Gonyleptidae). **Invertebrate Systematics**, v. 24, 509-538.

- Pinto-da-Rocha R, Bragagnolo C. 2017 Cladistic analysis of the family Nomoclastidae with descriptions of a new genus and eight new species (Opiliones, Laniatores). **Invertebrate Systematics**, v. 31, 91-123.
- Pinto-da-Rocha R, Bragagnolo C, Marques FPL, Junior MA. 2014 Phylogeny of harvestmen family Gonyleptidae inferred from a multilocus approach (Arachnida: Opiliones). **Cladistics**, v. 30, 519-539.
- Polis GA, Sissom WD. 1990 **The Biology of Scorpions**. California, Stanford University Press.
- Ruther J, Thal K, Steiner S 2011. Pheromone communication in *Nasonia vitripennis*: abdominal sex attractant mediates site fidelity of releasing males. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, 161-165.
- Schulz S. 2013 Spider pheromones – a structural perspective. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, 1-14.
- Shultz JW. 2005 Preliminary analysis of mating in *Leiobunum nigripes* (Opiliones) and diversification of male reproductive structures in *Leiobunum*. **News American Arachnology Society**, v. 72, 11.
- Sreng L. 2006 Cockroach tergal glands producing female sex attractant pheromones and male aphrodisiacs in particular in the subfamily Blaberinae (Blattaria: Blaberidae). **European Journal of Entomology**, v 103, 817-829.
- Sonenshine DE. 2006 Tick pheromones and their use in tick control. **Annual Review of Entomology**, v. 51, 557-580.
- Stefanini-Jim RL, Soares HEM, Jim J. 1987 Notas sobre a biologia de *Cadeadoius niger* (Mello-Leitão, 1935) (Opiliones, Gonyleptidae, Progonyleptoidellinae). In: Anais do XX Encontro Brasileiro de Etologia, pp. 24. Botucatu, São Paulo.
- Vahed K. 1998. The function of nuptial feeding in insects: review of empirical studies. **Biological Reviews**, v. 73, 43-78.
- Vahed K. 2007. All that glisters is not gold: sensory bias, sexual conflict and nuptial feeding in insects and spiders. **Ethology**, v. 113, 105-127.

- Wen P, Mo J, Lu C, Tan K, Sobotník J, Sillam-Dussès D. 2015 Sex-pairing pheromone of *Ancistrotermes dimorphus* (Isoptera: Macrotermitinae). **Journal of Insect Physiology**, v. 83, 8-14.
- Willemart RH, Farine J-P, Peretti AV, Gnaspini P. 2006 Behavioral rules of the sexually dimorphic structures in the male harvestman, *Phalangium opilio* (Opiliones: Phalangidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, 1763-1774.
- Willemart RH, Chelini MC, de Andrade R, Gnaspini P. 2007 An ethological approach to a SEM survey on sensory structures and tegumental gland openings of two neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). **Italian Journal of Zoology**, v. 74, 39-54.
- Willemart RH, Giribet G. 2010 A scanning electron microscopic survey of the cuticle in Cyphophthalmi (Arachnida, Opiliones) with the description of novel sensory and glandular structures. **Zoomorphology** 2010, v. 129, 175-183.
- Willemart RH, Pérez-González A, Farine JP, Gnaspini P. 2010 Sexually dimorphic tegumental gland openings in Laniatores (Arachnida, Opiliones), with new data on 23 species. **Journal of Morphology**, v. 271, 641-653.
- Wyatt TD. 2014 **Pheromones and animal behavior: Chemical Signals and Signature Mixes**. Cambridge: Cambridge University Press.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Lista das espécies utilizadas na microscopia eletrônica de varredura, com a taxonomia e o número de voucher. Todas as espécies são da subordem Laniatores, superfamília Gonyleptoidea, família Gonyleptidae.

Subfamília	Espécies	Voucher #
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus orguensis</i>	MZUSP67749
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus orguensis</i>	MZUSP67751
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus orguensis</i>	MZUSP16015
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus fuscopictus</i>	MZUSP1526
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus fuscopictus</i>	MZUSP10613
Progonyleptoidellinae	<i>Cadeadoius niger</i>	MZUSP17985
Progonyleptoidellinae	<i>Cadeadoius niger</i>	MZUSP30152
Progonyleptoidellinae	<i>Moreiranula mamillata</i>	MZUSP28541
Progonyleptoidellinae	<i>Moreiranula mamillata</i>	MZUSP10587
Progonyleptoidellinae	<i>Moreiranula mamillata</i>	MZUSP16013
Progonyleptoidellinae	<i>Moreiranula moreirae</i>	MZUSP16020
Progonyleptoidellinae	<i>Moreiranula moreirae</i>	MZUSP21255
Progonyleptoidellinae	<i>Leptocnema sulphurea</i>	MZUSP15492
Gonyleptinae	<i>Neosadocus variabilis</i>	MZUSP879
Gonyleptinae	<i>Neosadocus maximus</i>	MZUSP27916
Gonyleptinae	<i>Neosadocus bufo</i>	MZUSP36412
Gonyleptinae	<i>Holoversia nigra</i>	MZUSP28217
Sodreaninae	<i>Sodreana sodreana</i>	MZUSP1925
Sodreaninae	<i>Sodreana sodreana</i>	MZUSP28743
Sodreaninae	<i>Sodreana granulata</i>	MZUSP14160
Sodreaninae	<i>Sodreana barbiellinii</i>	MZUSP16242
Sodreaninae	<i>Sodreana barbiellinii</i>	MZUSP16247
Sodreaninae	<i>Sodreana leprevosti</i>	MZUSP16803
Sodreaninae	<i>Sodreana leprevosti</i>	MZUSP18798
Sodreaninae	<i>Sodreana leprevosti</i>	MZUSP19259
Sodreaninae	<i>Sodreana glaucoi</i>	MZUSP16881
Sodreaninae	<i>Sodreana glaucoi</i>	MZUSP17731

Sodreaninae	<i>Sodreana glaucoi</i>	MZUSP18667
Sodreaninae	<i>Sodreana hatschbachi</i>	MZUSP19229
Sodreaninae	<i>Sodreana hatschbachi</i>	MZUSP30134
Sodreaninae	<i>Sodreana hatschbachi</i>	MZUSP36155

Tabela 2. Largura do astrágalo do metatarso da perna IV de fêmeas e machos, medidas em um indivíduo de cada sexo e espécie.

Subfamília	Espécies	Medidas do metatarso IV	
		Fêmea (µm)	Macho (µm)
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus orguensis</i>	166,6	344,4
	<i>Progonyleptoidellus fuscipictus</i>	226	293,3
	<i>Cadeadoius niger</i>	361	397,2
	<i>Moreiranula mamillata</i>	188,9	284,7
	<i>Moreiranula moreirae</i>	255	333,3
	<i>Leptocnema sulphurea</i>	127,7	127,7
Gonyleptinae	<i>Neosadocus variabilis</i>	318	318
	<i>Neosadocus maximus</i>	318,18	430
	<i>Neosadocus bufo</i>	335,4	570,3
	<i>Holoversia nigra</i>	292,1	306,2
Sodreaninae	<i>Sodreana sodreana</i>	275	406,6
	<i>Sodreana granulata</i>	272,72	390,9
	<i>Sodreana barbiellinii</i>	266,66	280
	<i>Sodreana leprevosti</i>	246,5	366,6
	<i>Sodreana glaucoi</i>	241,66	477,8
	<i>Sodreana hatschbachi</i>	260	342,1

Figura 1. Região prolateral do tarso I do opilião *Sodreana leprevosti* (Sodreaninae) macho.

Figura 2. Região retrolateral do metatarso IV do opilião *Leptocnema sulphurea* (Progonyleptoidellinae) fêmea. Calcâneo (cal) e astrágalo (ast) são nitidamente delimitados. Barra de escala = 100 µm.

Figura 3. Aberturas glandulares no basitarso I do opilião *Cadeadoius niger* (Progonyleptoidellinae). Poros são encontrados dentro da abertura (círculo). A: Região retrolateral, 3º tarsômero do macho. B: Mesma região na fêmea mostra ausência de abertura glandular. C: Região retrolateral, 4º tarsômero do macho. No inset a linha tracejada reta é referente à medida que foi feita para as aberturas do tarso I. D: Mesma região da fêmea mostra ausência de abertura glandular. E: Região prolateral do 4º tarsômero no macho. F: Mesma região da fêmea mostra ausência de abertura glandular. Barra de escala = 100 µm; Barra de escala insets = 10 µm.

Figura 4. Diferenças do intumescimento do metatarso IV entre machos e fêmeas das três subfamílias de opiliões estudadas. A: *Progonyleptoidellus orguensis* (Progonyleptoidellinae) macho, retrolateral. A linha tracejada é referente à medida do metatarso IV que foi feita para todas as espécies. B: Mesma região da perna na fêmea. C: *Neosadocus maximus* (Gonyleptinae), prolateral. D: Mesma região da perna na fêmea. E: *Sodreana glaucoi* (Sodreaninae), prolateral. F: Mesma região da perna na fêmea. Barra de escala = 100 μ m.

Figura 5. Filogenia adaptada de Pinto-da-Rocha & Bragagnolo (2010) e Pinto-da-Rocha et al (2014). * são as espécies em que o macho possui maior quantidade de poros no metatarso da perna IV do que as fêmeas. Ramos em verde representam as espécies com aberturas no basitarso da perna I e os ramos em vermelhos as espécies que não possuem aberturas nessa mesma região. Os ramos em preto representam as espécies não analisadas para esses caracteres.

Figura 6. Filogenia adaptada de Pinto-da-Rocha & Bragagnolo (2010) e Pinto-da-Rocha et al (2014) com adição das espécies estudadas nesse trabalho (*Neosadocus variabilis*, *Neosadocus bufo*, *Progonyleptoidellus fuscipictus*, *Progonyleptoidellus orguensis*, *Cadeadoius niger*, *Moreiranula moreira*, *Moreiranula mamillata* e *Leptocnema*

sulphurea), sem posição filogenética definida. * são as espécies em que o macho possui maior quantidade de poros no metatarso da perna IV do que as fêmeas. Ramos em verde representam as espécies com aberturas no basitarso da perna I e os ramos em vermelhos as espécies que não possuem aberturas nessa mesma região. Os ramos em preto representam as espécies não analisadas para esses caracteres.

Figura 7. Aberturas glandulares no basitarso I do opilião *Holoversia nigra* (Gonyleptinae). Poros são encontrados dentro da abertura (círculo). A: Região retrolateral, 2º tarsômero do macho. B: Mesma região mostra ausência de aberturas no 2º e 3º tarsômero na fêmea. C: Região prolateral, 2º tarsômero do macho. D: Mesma região mostra ausência de aberturas no 2º e 3º tarsômero da fêmea. E: Região retrolateral, 3º tarsômero do macho. F: Região prolateral, 3º tarsômero do macho.

Figura 8. Aberturas glandulares no basitarso I do opilião *Sodreana barbiellinii* (Sodreaninae). Poros são encontrados dentro da abertura (círculo). A: Região prolateral, 2º tarsômero do macho. B: Mesma região mostra a fêmea com glândula. C: Região retrolateral, 2º tarsômero do macho. D: Mesma região mostra ausência da glândula na fêmea. E: Região prolateral, 3º tarsômero do macho. F: Mesma região mostra ausência da glândula na fêmea. G: Região retrolateral, 3º tarsômero do macho. H: Mesma região mostra ausência de glândula na fêmea.

Figura 9. Aberturas no basitarso I do opilião *Sodreana leprevosti* (Sodreaninae). Poros encontrados dentro da abertura (círculo). A: Região prolateral, 3º tarsômero do macho. B: Mesma região mostra ausência de glândula na fêmea.

Figura 10. Aberturas no basitarso I do opilião *Sodreana hatschibachi* (Sodreaninae). A e B: Região prolateral, 3º tarsômero do macho. C e D: Poros encontrados dentro da abertura (círculo). E: Mesma região mostra ausência de glândula na fêmea.

Figura 11. Diferença de poros do metatarso IV entre machos e fêmeas de Progonyleptoidellinae. A: Macho *Cadeadoius niger*, retrolateral. B: Fêmea *Cadeadoius niger*, prolateral. C: Macho *Moreiranula moreira*, retrolateral. D: Fêmea *Moreiranula moreira*, prolateral. E: Macho *Moreiranula mamillata*, retrolateral. F: Fêmea *Moreiranula mamillata* prolateral. Setas indicam alguns dos poros presentes na perna. Barra de escala = 50 μm .

Figura 12. Diferença de poros do metatarso IV entre machos e fêmeas de Progonyleptoidellinae A: Macho *Leptocnema sulphurea*, prolateral. B: Fêmea *Leptocnema sulphurea*, prolateral. C: Macho *Progonyleptoidellus orguensis*, prolateral. D: Fêmea *Progonyleptoidellus orguensis*, retrolateral. E: Macho *Progonyleptoidellus fuscipictus*, prolateral. F: Fêmea *Progonyleptoidellus fuscipictus*, prolateral. Setas indicam alguns dos poros presentes na perna. Barra de escala = 50 μ m.

Figura 13. Diferença de poros do metatarso IV entre machos e fêmeas de Gonyleptinae. A: Macho *Holoversia nigra*, prolateral. B: Fêmea *Holoversia nigra*, prolateral. C: Macho *Neosadocus maximus*, prolateral. D: Fêmea *Neosadocus maximus*, prolateral. E: Machos *Neosadocus bufo*, prolateral. F: Fêmea *Neosadocus bufo*, prolateral. G: Macho *Neosadocus variabilis*, prolateral. H: Fêmea *Neosadocus variabilis*, prolateral. Setas indicam alguns dos poros presentes na perna. Barra de escala = 50 µm.

Figura 14. Diferença de poros do metatarso IV entre machos e fêmeas de Sodreaninae. A: Macho *Sodreana barbiellinii*, prolateral. B: Fêmea *Sodreana barbiellinii*, prolateral. C: Macho *Sodreana glaucoi*, prolateral. D: Fêmea *Sodreana glaucoi*, prolateral. E: Macho *Sodreana granulata*, prolateral. F: Fêmea *Sodreana granulata*, prolateral. Setas indicam alguns dos poros presentes na perna. Barra de escala = 50 μm .

Figura 15. Diferença de poros do metatarso IV entre machos e fêmeas de Sodreaninae
 A: Macho *Sodreana hatschibachi*, prolateral. B: Fêmea *Sodreana hatschibachi*, prolateral. C: Macho *Sodreana leprevosti*, prolateral. D: Fêmea *Sodreana leprevosti*, prolateral. E: Macho *Sodreana sodreana*, prolateral. F: Fêmea *Sodreana sodreana*, prolateral. Setas indicam alguns dos poros presentes na perna. Barra de escala = 50 µm.

**Capítulo 2: Morfologia interna das glândulas sexualmente dimórficas de
Progonyleptoidellus striatus Roewer 1913 (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae)**

Thaiany Miranda Costa^{1,2} & Rodrigo Hirata Willemart^{1,2,3}

¹ Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, Rua Arlindo Bétio, 1000, Ermelino Matarazo, São Paulo, SP 03828-000, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 321, Travessa 14, São Paulo, SP 05508-090, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Rua Professor Artur Riedel, 275, Jardim Eldorado, Diadema, SP 09972-270, Brasil.

Autor para correspondência: Rodrigo Hirata Willemart (E-mail: willemart@usp.br)

Resumo: Apesar de diversos trabalhos sugerirem a presença de glândulas sexualmente dimórficas nas quatro subordens de Opiliones, há poucos trabalhos que investigam essas glândulas histologicamente. Morfologia interna fornece importantes informações sobre o funcionamento e composição das secreções. Para isso, utilizamos técnicas histológicas e ultraestruturais para estudar a morfologia interna de duas glândulas de *Progonyleptoidellus striatus* (Progonyleptoidellinae): uma no basitarso das pernas I e a outra no metatarso das pernas IV. Adicionalmente, investigamos a composição histológica e ultraestrutural da área glandular no metatarso IV. Encontramos diferenças entre os sexos, tanto na morfologia interna como externa: machos possuem intumescimentos das áreas glandulares e internamente possuem células glandulares ausentes nas fêmeas. Encontramos abundantes retículos endoplasmáticos rugosos, lisos e mitocôndrias, além de Complexo de Golgi bem desenvolvido na perna I dos machos. Diferentemente da perna I, não encontramos retículos endoplasmáticos lisos na perna IV, o que pode implicar em composições de produtos secretórios diferentes para as pernas. Nas duas pernas encontramos abundância de vesículas secretoras.

Abstract: Although several studies suggest the presence of sexually dimorphic glands in the four suborders of Opiliones, there are few studies that investigate these glands

histologically. Internal morphology provides important information about the functioning of the glands and the composition of secretions. Here we used histological and ultrastructural techniques to study the internal morphology of two glands of *Progonyleptoidellus striatus* (Progonyleptoidellinae): one in the basitarsus of legs I and another in the metatarsus of legs IV. We found differences between the sexes, both in internal and external morphology, in which males have swollen of the glandular areas and internally the males have glandular cells, absent in females. We found abundant rough, smooth endoplasmic reticulum and mitochondria, as well as Golgi Complex well developed in legs I of males. In contrast, we did not find smooth endoplasmic reticulum in legs IV, which may result in different compositions of glandular products in each leg. In both legs we found abundance great number of secretory vesicles.

Palavras chave: Progonyleptoidellinae, feromônio, morfologia, histologia

1. Introdução

Estímulos químicos são considerados uma das principais fontes de informações para um animal interpretar o meio, sendo ainda uma das formas mais antigas de comunicação na história evolutiva dos animais (Snodgrass 1926, Wyatt 2014). De modo geral os estímulos químicos são classificados como semioquímicos, mas quando usados na comunicação intraespecífica são chamados de feromônios (Wyatt 2014).

Os feromônios são subdivididos de acordo com os comportamentos que medeiam, atuando na agregação, alarme, orientação, trilhas, reconhecimento individual, sexual ou territorial (Wyatt 2014). Quando a comunicação possui um papel sexual ela é intermediada por feromônios sexuais, sendo estes geralmente produzidos por glândulas exócrinas sexualmente dimórficas (Wyatt 2014). Glândulas com essa função são amplamente encontradas nos vertebrados (Mamíferos: Hutchings e White 2000; Répteis: Carazo et al 2011, Font et al 2012, Wilmes et al 2012) e invertebrados, (Mariposas: KonDo et al 2012, Koutroumpa e Jacquin-Joly 2014; Cupins: Wen et al 2015; Formigas: Billen 2009).

Os artrópodes são os principais animais estudados com relação à comunicação química e sexual com mais da metade dos trabalhos realizados utilizando espécies da classe Insecta como modelo (Johansson e Jones 2007, Symonds e Elgar 2008, Wyatt 2014). Dentre os aracnídeos, terceira linhagem mais diversa entre os artrópodes, sabe-se

que diversos grupos apresentam glândulas sexualmente dimórficas (Polis 1990, Kuwara 2004, Michalik e Uhl 2011), entretanto estudos acerca da morfologia dessas glândulas ainda escassos. Isso também vale para opiliões, animais em que a comunicação química desempenha importante papel (Fernandes e Willemart 2014, Murayama e Willemart 2015) mas sobre os quais muito pouco se sabe sobre tais glândulas.

Diversos trabalhos evidenciaram a presença de glândulas sexualmente dimórficas nas quatro subordens de Opiliones (Martens 1973, Donaldson e Grether 2007, Willemart et al 2007, Willemart e Giribet 2010, Willemart et al 2010, Sharma et al 2012, Fernandes e Willemart 2014, capítulo 1 desta dissertação). Trabalhos comportamentais mostram machos raspando as pernas I e IV contra o substrato e/ou no próprio corpo (Fernandes e Willemart 2014, Murayama e Willemart 2015), comportamento este que os autores sugerem ter implicações sexuais, com machos secretando feromônios que seriam deixados no ambiente. Porém, trabalhos histológicos são fundamentais para confirmar a natureza do aparato glandular associado às aberturas dessas pernas e quais são os tipos de vesículas que estariam sendo produzidas pelas glândulas. Entretanto, ainda são poucos os estudos que investigam a morfologia interna das glândulas sexualmente dimórficas em Opiliones, havendo apenas dois trabalhos em Laniatores que investigaram a morfologia interna da perna I (Proud e Felgenhauer 2011, 2013). E apesar do metatarso da perna IV em Laniatores também ser descrito como sexualmente dimórfico, sua anatomia interna ainda não foi estudada.

Proud e Felgenhauer (2011) confirmaram que poros no basitarso I de *Rhopalocranaus albilineatus* (Manaosbiidae) fazem parte de um sistema glandular. Em 2013 os mesmos autores descreveram aberturas no tarso I de representantes das famílias Cosmetidae, Gonyleptidae e Cranidae e também confirmaram a presença de áreas glandulares. Entretanto, o arranjo interno da área glandular associada aos poros difere entre famílias que possuem a morfologia externa diferentes, como no caso de Manaosbiidae e Cosmetidae (Proud e Felgenhauer 2013). Utilizamos técnicas histológicas e ultraestruturais para estudar a morfologia interna de duas glândulas de *Progonyleptoidellus striatus* (Progonyleptoidellinae): uma no basitarso das pernas I e a outra no metatarso das pernas IV.

2. Material e Métodos

2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Examinamos exemplares de dois machos e duas fêmeas adultas do opilião *Progonyleptoidellus striatus* depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, Brasil, MZUSP 31767.

Por meio de microscopia eletrônica de varredura, analisamos a região do basitarso da perna I e metatarso da perna IV. Essas regiões foram dissecadas e em seguida passaram por quatro etapas de limpeza em ultrassom, com duração de seis minutos cada: (1) em água destilada, (2) em solução 10:1 de água destilada e detergente, (3 e 4) com água destilada, para reforçar a retirada do detergente das partes dissecadas. Em seguida, secamos as pernas com papel toalha e as colamos com fita adesiva em stubs de alumínio. Os stubs foram mantidos em uma estufa a 40° C por no mínimo 24h e metalizados com ouro (Sputter Coater Balzer SCD 50) para análise com o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940).

2.2 Microscopia de luz e transmissão

Foram utilizados dois exemplares de *Progonyleptoidellus striatus* coletados no Rio Cachoeira da Bacia, próximo ao Km 69 da Rodovia Oswaldo Cruz (SP-125), situado na cidade de Ubatuba, Estado de São Paulo (Brasil), em maio de 2016 para os ensaios microscópicos.

Utilizamos a microscopia de luz (ML) com cortes semifinos (0,5 µm) para investigar a presença e a localização de células glandulares nas pernas I e IV. A partir disso, prosseguimos com cortes ultrafinos (60 a 90 nm) para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), com o intuito de analisar a ultraestrutura da região glandular das pernas I e IV.

Primeiramente, anestesiámos os animais deixando-os por três minutos dentro de um refrigerador a 4° C. Dissecamos o basitarso da perna I e o metatarso da perna IV de ambos os sexos em tampão frio de NaH₂PO₄·2H₂O e depois fixamos em mistura de glutaraldeído a 2,5% e 2% de paraformaldeído em 0,1M de tampão NaH₂PO₄·2H₂O e mantido a 4°C durante 3 semanas (modificado de Gainett et al 2017). Depois, lavamos com tampão PBS Siena. Os tecidos foram pós-fixados em 2% de tetróxido de ósmio por 3h e lavados novamente em tampão PBS Siena. Para incorporação em resina, o material foi gradualmente desidratado em séries a partir de etanol a 70% até 100% e depois gradualmente incorporado em meio Spurr (EMS, Catalog 14300) (Spurr 1969) com uma

série de álcool/resina 2/1 (6 horas), 1/1 (durante a noite) 1/3 (6 horas) e resina pura (durante a noite). Os cortes foram seccionados utilizando lâminas de vidro em um micrótomo rotativo, conduzindo as seções transversais e longitudinais. Cortamos as seções semifinas utilizando um ultra micrótomo SORVALL MT2-B. Depois de cortadas, as partes foram colocadas em lâminas de vidro e coradas com azul de metileno e em seguida cobertas com lamínulas de vidro utilizando entellan (Merck). Cortamos as seções ultrafinas utilizando um Ultratum UCT Ultramicrotome, fizemos a contrastação primeiramente com acetato de uranila 1% em solução aquosa durante 12h na geladeira. Fizemos a segunda etapa da contraste eletrônica com citrato de chumbo diretamente nos cortes. Examinamos os cortes com um microscópio electrónico de transmissão (Zeiss EM 900) operado a 80 kV.

2. Resultados

Encontramos aberturas nos 2º, 3º e 4º (distal-proximal) tarsômeros no basitarso da perna I dos machos de *Progonyleptodellus striatus*, nas regiões pro e retrolaterais. Os machos possuem o metatarso da perna IV intumescido e com maior número de poros (Figura 1A, C, E e G).

Cortes histológicos do 3º tarsômero da perna I do macho mostram células glandulares que ocupam a metade do diâmetro da perna (Figura 1B), com núcleos e nucléolos muitas vezes aparentes e inúmeras vesículas secretoras arredondadas em volta (Figuras 1B e F). Alguns ductos são visíveis na cutícula e no citoplasma (Figura 1B). Já os cortes da mesma região da perna I da fêmea e não apresentam evidências de células glandulares (Figura 1D).

A morfologia interna da região intumescida também apresenta dimorfismo sexual quanto aos componentes celulares. No citoplasma da perna I da fêmea, encontramos células com núcleo com forma irregular, complexo de Golgi bem desenvolvido, poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Figura 2). Não conseguimos visualizar ductos por meio dos cortes semi-finos ou na transmissão. Algumas vesículas foram encontradas bem próximas à cutícula. Essas vesículas também são encontradas nos machos, na região anterior ao local das células de secreção.

O macho possui, no basitarso da perna I, quantidades muito maiores de organelas citoplasmáticas do que a fêmea. Encontramos complexo de Golgi bem desenvolvidos, localizados próximos aos núcleos (Figura 3A). Os núcleos são

geralmente irregulares com porções de heterocromatina ao longo do perímetro (Figura 4A). Os retículos endoplasmáticos rugosos e as mitocôndrias são abundantes e encontradas por toda extensão do citoplasma (Figuras 3 e 4). O retículo endoplasmático liso nos machos aparece bem desenvolvido (Figura 3D) e microvilosidades também estão presentes (Figuras 3B e 4B). Nem o retículo endoplasmático liso, nem as microvilosidades foram encontrados na fêmea. Entre a cutícula e um grande núcleo, encontramos duas bolsas cheias de vesículas secretórias que parecem como reservatórios (Figura 4A). Os retículos endoplasmáticos rugosos juntamente com algumas mitocôndrias circundam esses reservatórios (Figura 4A). Numerosas vesículas de secreção são encontradas por todo o citoplasma (Figuras 3 e 4). Alguns ductos observados carregam secreções (Figura 4E, F e G).

Cortes histológicos do metatarso IV mostram os machos com células glandulares espalhadas por toda extensão da perna, diferentemente da fêmea que não possui (Figuras 1F e H). O conteúdo encontrado no citoplasma das células da perna IV da fêmea não diferiu do descrito para a perna I (Figura 5). Encontramos poucas organelas e algumas vesículas secretoras próximas à cutícula (Figura 5). Por outro lado, no citoplasma das células da perna IV do macho encontramos uma abundância de organelas e vesículas de secreções por toda extensão da perna. As vesículas de secreção ocupam a maior parte do espaço dentro do citoplasma (Figura 6 e 7), fazendo com que os núcleos muitas vezes fiquem deslocados basalmente.

Retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias estão intercalados com as vesículas secretoras (Figuras 6 e 7D, E e F), sendo possível enxergar os ribossomos aderidos aos retículos endoplasmáticos rugosos. Encontramos microvilosidades nos machos, ausentes na fêmea (Figura 6E). Os ductos são encontrados com mais facilidade do que na perna I (Figura 7A-C). Encontramos vesículas, partes de retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias livres no citoplasma (Figura 7F).

Discussão

Mostramos que há dimorfismo sexual nas pernas I e IV do opilião *Progonyleptoidellus striatus* tanto externa quanto internamente. Os machos possuem aberturas no 2º, 3º e 4º tarsômeros do basitarso da perna I que estão ausentes nas fêmeas. No metatarso da perna IV, os machos possuem mais poros e a perna é mais intumescida do que nas fêmeas. Com o estudo da morfologia interna, verificamos que

os machos possuem células secretoras que, no caso da perna I, ocupam a metade do diâmetro da perna. Na perna IV, as células estão distribuídas por toda a extensão do astrágalo. A microscopia eletrônica de transmissão deixou ainda mais clara essa diferença, uma vez que encontramos células glandulares nas pernas dos machos que não encontramos nas pernas da fêmea.

A morfologia externa das aberturas glandulares na perna I difere entre espécies estudadas de Laniatores (Proud e Felgenhauer 2013) e *Progonyleptoidellus striatus*. Internamente, as unidades glandulares ocupam a metade do diâmetro da perna I em *P. striatus*, enquanto *Glysterus* sp. possui as células glandulares ocupando uma área menor. Entretanto, pode haver diferenças sazonais que desconhecemos, ligadas à época reprodutiva.

Noirot e Quennedey (1974, 1991) propuseram um sistema de classificação para diferenciar glândulas epidérmicas, dividindo-as em três tipos segundo a cutícula e o modo de liberação das secreções: tipo I) glândulas que estão em contato direto com a cutícula; tipo II) glândulas que não estão em contato direto com a cutícula e não há canais ligados a poros glandulares. Nesse caso, para a secreção ser eliminada, ela passa antes para uma célula epidérmica; e tipo III) glândulas que estão em contato com poros glandulares por meio de canais ou ductos. Seguindo essa classificação, podemos concluir que as glândulas encontradas no basitarso I e metatarso IV de *Progonyleptoidellus striatus* são do tipo III. Conseguimos distinguir pelo menos duas células: uma célula secretora e uma célula do canal. O tipo III da classificação glandular parecer ser comum em Opiliones, por estar presente no basitarso da perna I em outras espécies de Laniatores (Proud e Felgenhauer 2011, 2013). Essa morfologia glandular também pode ser encontrada em glândulas quelicerais de Dyspnoi, sendo inclusive associadas a comportamentos reprodutivos (Martens 1969b) e em glândula tarsal de Cyphophthalmi (Martens 1969a, 1973, 1979, Proud e Felgenhauer 2011, 2013).

As glândulas da perna I das espécies estudadas das famílias Cranidae, Gonyleptidae, Cosmetidae e Manaosbiidae possuem retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias abundantes, com alguns complexos de Golgi (Proud e Felgenhauer 2011, 2013). As glândulas da perna I de *P. striatus* diferem das descritas em outros Laniatores por possuírem um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido em relação ao rugoso, que também está presente. O retículo endoplasmático liso é comum em glândulas que

liberam feromônios, sendo encontrado nas glândulas sexuais dos insetos. O retículo endoplasmático liso está tipicamente ligado à produção de secreções não proteicas, como lipídios (Noirot e Quennedey 1991) associados à biossíntese de feromônios sexuais (Percy- Cunningham e Macdonald 1987, Tillman et al 1999, Hall et al 2012), inclusive em secreções voláteis (Noirot e Quennedey 1974, Quennedey 1998). Embora opiliões tenham sido tradicionalmente relatados como bastante dependentes de quimiorrecepção de contato (ver Willemart et al 2009), alguns trabalhos têm descrito olfação à curta distância (Machado et al 2002; Willemart e Chelini 2007, Costa e Willemart 2013). Recentemente, Gainett et al (2017) descreveu receptores olfativos em todas as principais linhagens de Laniatores. Uma análise química seria necessária, mas talvez as secreções produzidas no retículo endoplasmático liso sejam de natureza proteica e lipídica e sejam voláteis.

Diferentemente do que ocorre na perna I, o metatarso da perna IV possui abundantes retículos endoplasmáticos rugosos, associados a inúmeras mitocôndrias, organelas biossintetizadoras de proteínas (Kuehnel 2003). Diferentemente dos lipídios, as proteínas parecem estar associadas a moléculas não voláteis (Noirot e Quennedey 1974, Liang e Schal 1993). Liang e Schal (1993) discutem que moléculas de proteínas podem influenciar a velocidade de volatilização dos feromônios sexuais nas secreções, tornando as mais lentas. Em *Progonyleptoidellus striatus*, a produção glandular da perna IV é provavelmente proteica.

As microvilosidades citoplasmáticas foram encontradas apenas nos cortes histológicos da perna IV do macho *Progonyleptoidellus striatus*, não estando presentes na fêmea, resultado esse semelhante aos encontrados por Proud e Felgenhauer (2013) para algumas espécies em Laniatores. Essas microvilosidades estão cercadas por vesículas de secreção e aparentemente apresentam morfologia comum em Laniatores (Proud e Felgenhauer 2013, este trabalho). As microvilosidades são comumente descritas em glândulas e geralmente estão associadas ao transporte rápido de materiais, pois aumentam a superfície de contato, acelerando o transporte das vesículas para o canal onde as secreções irão ser liberadas para o ambiente (Liang e Schal 1993). As microvilosidades podem ainda facilitar o transporte entre a hemolinfa e os retículos endoplasmáticos, como descrito para aranhas (Blest e Taylor, 1977).

A biologia reprodutiva de *Progonyleptoidellus striatus* foi pouco estudada, de maneira que a função das glândulas basitarsais e metatarsais ainda não é clara. Entretanto, sabemos que espécies com glândulas similares na mesma subfamília (Murayama e Willemart 2015) e em outra família raspam as glândulas do metatarso das pernas I e IV no ambiente e/ou em seu próprio corpo (Fernandes e Willemart 2014). Em *Progonyleptoidellus striatus*, machos guardam os ovos e são ativos durante o período noturno, assim como *Iporangaia pustulosa*, que pertence à mesma subfamília (Machado et al 2004). Uma das hipóteses do uso da glândula metatarsal levantada por Murayama e Willemart (2015) é que os machos marcam os arredores e maximizam a atração de fêmeas quando deixam temporariamente as desovas (Caetano e Machado 2013). Os nossos dados sugerem que a perna I pode liberar secreções voláteis, que podem funcionar para atração a distância nesse caso. E os nossos dados também sugerem que o metatarso da perna IV provavelmente produz secreções menos voláteis, que poderiam ser utilizadas para marcação de território a exemplo do que fazem mamíferos, por exemplo (Wyatt 2014). Talvez machos de *P. striatus* deixem secreções sexuais no ambiente embora também não possamos descartar que possam usá-las durante o acasalamento (ver Dias e Willemart 2016).

Agradecimentos

Nós agradecemos aos membros do LESCA: Jéssica Dias, Guilherme Gainett, Gabriel Murayama, Guilherme Pagoti e Júlio Segovia e ao Francisco Dal Vechio pela revisão do trabalho. Ao Norton Silva e Guilherme Pagoti pela coleta dos exemplares. Ao Alfonso Vivai por auxiliar nas fotografias. Ao Prof. Dr. Alberto Augusto G. F. C. Ribeiro e a assistência do técnico do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP: Waldir Caldeira. À CAPES processo 133536/2016-5 e à FAPESP processo 2015/01518-9 pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Billen J. 2009 Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. **Arthropod Structure & Development**, v. 38, 2-15.
- Blest AD, Taylor HH. 1977 The clypeal glands of *Mynoglenes* and of some other linyphiid spiders. **Journal of Zoology**, v. 183, 473-493.

- Caetano DS, Machado G. 2013 The ecological tale of Gonyleptidae (Arachnida, Opiliones) evolution: phylogeny of a Neotropical lineage of armoured harvestmen using ecological, behavioural and chemical characters. **Cladistics**, v. 29, 589-609.
- Carazo P, Font E, Desfilis E. 2011 The role of scent marks in female choice of territories and refuges in a lizard (*Podarcis hispanica*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 125, 362-365.
- Costa TM, Willemart, RH. 2013 First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. **Zoologia**, v. 30, 359-361.
- Dias JM, Willemart RH. 2016 Do sexually dimorphic glands in the harvestman *Gryne perlata* (Arachnida, Opiliones) release contact pheromones during mating? **European Journal of Entomology**, v. 113, 184-191.
- Donaldson ZR, Grether GF. 2007 Tradition without social learning: scent-mark-based communal roost formation in a Neotropical harvestman (*Prionostemma* sp.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, 801-809.
- Fernandes NS, Willemart RH. 2014 Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. **Comptes Rendus Biologie**, v. 337, 269-275.
- Font E, Barbosa D, Sampedro C, Carazo P. 2012 Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: Studies of scent mark function in *Podarcis* wall lizards. **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, 9-17.
- Gainett G, Michalik P, Müller CHG, Giribet G, Talarico G, Willemart RH, 2017 Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). **Arthropod Structure & Development**, v. 46, 178-195.
- Greenfield MD. 2002 **Signalers and Receivers**. Oxford: Oxford University Press.

- Hall DR, Amarawardana L, Cross JV, Franke W, Boddum T, Hillbur Y. 2012 The chemical ecology of cecidomyiid midges (Diptera: Cecidomyiidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, 2-22.
- Hutchings MR, White PCL. 2000 Mustelid scent-marking in managed ecosystems: implications for population management. **Mammal Review**, v. 30, 157-169.
- Johansson BG, Jones TM. 2007 The role of chemical communication in mate choice. **Biological Reviews**, v. 82, 265-289.
- KonDo Y, Naka H, Tsuchida K. 2012 Pheromones and body coloration affect mate recognition in the Japanese nine-spotted moth *Amata fortunei* (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of Ethology**, v. 30, 301-308.
- Koutroumpa FA, Jacquin-Joly E. 2014 Sex in the night: Fatty acid-derived sex pheromones and corresponding membrane pheromone receptors in insects. **Biochimie**, v. 107, 15-21.
- Kuwahara Y. 2004 Chemical ecology of astigmatid mites. In: Cardé RT, Miller JG, editors. **Advances in Insect Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kuehnelt W. 2003. **Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy**. New York: Thieme.
- Liang D, Schal C. 1993 Ultrastructure and maturation of a sex pheromone gland in the female german cockroach, *Blattella germanica*. **Tissue and Cell**, v. 25, 763-776.
- Machado G, Bonato V, Oliveira PS. 2002 Alarm communication: a new function for the scent- gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). **Naturwissenschaften**, v. 89, 357-60.
- Machado G, Requena GS, Buzatto BA, Osses F, Rosseto LM. 2004 Five new cases of paternal care in harvestmen (Arachnida: Opiliones): implications for the evolution of male guarding in the Neotropical family Gonyleptidae. **Sociobiology**, v. 44, 577-598.

- Martens J. 1969a Die Abgrenzung von biospezies auf biologisch-ethologischer und morphologischer grundlage am beispiel der gattung *Ischyropsalis* C.L. Koch 1839 (Opiliones: Ischyropsalididae). **Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere**, v. 96, 133-264.
- Martens J. 1969b Die Sekretabgabe während des Paarungsverhaltens von *Ischyropsalis* C.L. Koch (Opiliones). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 26, 513–523.
- Martens J. 1973 Feinstruktur der cheliceren-drüsen von *Nemastoma dentigerum* Canestrini (Opiliones: Nemastomatidae). **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 136, 121-137.
- Martens J. 1979 Feinstruktur der tarsal-drüse, von *Siro duricorius* (Joseph) (Opiliones, Sironidae). **Zoomorphologie**, v. 92, 77-93.
- Michalik P, Uhl G. 2011 Cephalic modifications in dimorphic dwarf spiders of the Genus *Oedothorax* (Erigoninae, Linyphiidae, Araneae) and their evolutionary implications. **Journal of Morphology**, v. 272, 814-832.
- Murayama GP, Willemart RH. 2015 Mode of use of sexually dimorphic glands in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. **Journal of Natural History**, v. 49, 1-11.
- Noirot C, Quennedey A. 1974 Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, v. 19, 61-80.
- Noirot C, Quennedey A. 1991 Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. **Annales de la Société Entomologique de France**, v. 27, 123-128.
- Percy-Cunningham JE, Macdonald JA. 1987 Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Prestwich GD, Blomquist GJ. **Pheromone Biochemistry**. Orlando: Academic press.

- Proud DN, Felgenhauer EF. 2011 Ultrastructure of the sexually dimorphic basitarsal glands of leg I in manaosbiid harvestmen (Opiliones, Laniatores). **Journal of Morphology**, v. 272, 872-882.
- Proud DN, Felgenhauer EF. 2013 Ultrastructure of the sexually dimorphic tarsal glands and tegumental glands in gonyleptoid harvestmen (Opiliones, Laniatores). **Journal of Morphology**, v. 274, 1203-1215.
- Polis GA. 1990 **The biology of scorpions**. California: Stanford University Press.
- Quennedey A. 1998 Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. **Microscopic Anatomy and Invertebrates**, v. 11, 177-207.
- Sharma PP, Buenavente PAC, Clouse RM, Diesmos AC, Giribet G. 2012 Forgotten gods: *Zalmoxidae* of the Philippines and Borneo (Opiliones: Laniatores). **Zootaxa**, v. 3280, 29-55.
- Spurr AR. 1969 A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, 31e4.
- Snodgrass RE. 1926 The morphology of insect sense organs and the sensory nervous system, v. 77, 1-80.
- Symonds MRE, Elgar MA. 2008 The evolution of pheromone diversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, 220-228.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ. 1999 Insect pheromones-an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, 481-514.
- Wen P, Mo J, Lu C, Tan K, Sobotník J, Sillam-Dussès D. 2015 Sex-pairing pheromone of *Ancistrotermes dimorphus* (Isoptera: Macrotermitinae). **Journal of Insect Physiology**, v. 83, 8-14.
- Willemart RH, Chelini MC. 2007 Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 123, 73-79.

- Willemart RH, Chelini MC, de Andrade R, Gnaspini P. 2007 An ethological approach to a SEM survey on sensory structures and tegumental gland openings of two neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). **Italian Journal of Zoology**, v. 74, 39-54.
- Willemart RH, Farine JP, Gnaspini P. 2009 Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. **Acta Zoologica**, v. 90, 209-227.
- Willemart RH, Giribet G. 2010 A scanning electron microscopic survey of the cuticle in Cyphophthalmi (Arachnida, Opiliones) with the description of novel sensory and glandular structures. **Zoomorphology** 2010, v. 129, 175-183.
- Willemart RH, Pérez-González A, Farine JP, Gnaspini P. 2010 Sexually dimorphic tegumental gland openings in Laniatores (Arachnida, Opiliones), with new data on 23 species. **Journal of Morphology**, v. 271, 641-653.
- Wilmes AT, Rheubert JL, Gruenewald DL, Kotaru T, Aldridge RD. 2012 Conspecific pheromone trailing and pheromone trail longevity in the African colubrid *Boaedon fuliginosus*. **African Journal of Herpetology**, v. 61, 159-168.
- Wyatt TD. 2014 **Pheromones and animal behavior: Chemical Signals and Signature Mixes**. Cambridge: Cambridge University Press.

Figuras

Figura 2. Diferença da morfologia externa e interna do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. A: Macho, região prolateral do 3º tarsômero da perna I. Abertura encontrada nessa região com poros cobertos por secreções (círculo). Escala inset = 10µm. B: Corte semi-fino transversal da região prolateral do 3º tarsômero da perna I, macho. C: Fêmea, região prolateral do 3º tarsômero da perna I. D: Corte semi-fino transversal da região proletral do 3º tarsômero da perna I, fêmea. E: Metatarso IV na região do astrágalo do macho. F: Corte semi-fino longitudinal do metatarso da perna IV do macho. G:

Metatarso IV na região do astrágalo da fêmea. H: Corte semi-fino longitudinal do metatarso da perna IV da fêmea. Escala = 50 μ m.

Figura 2. Imagens de microscopia de transmissão do 3º tarsômero da perna I da fêmea do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são transversais. A: Vesículas secretoras se situam próximas a cutícula. B: Complexo de Golgi bem desenvolvido com. C: Mitocôndrias próximas ao retículo endoplasmático rugoso. D: Complexo de Golgi bem desenvolvido e algumas vesículas. E: Núcleo irregular e retículo endoplasmático rugoso com algumas mitocôndrias próximos ao núcleo. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi. Escala = 1 μ m.

Figura 3. Imagens de microscopia de transmissão do 3º tarsômero da perna I do macho do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são transversais. A: Mitocôndrias, complexo de Golgi e os retículos endoplasmáticos rugosos são vistos próximos a um núcleo. B: Retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias circundam microvilosidades. C: O retículo endoplasmático rugoso é bem desenvolvido e muitas mitocôndrias são vistas entre os retículos. D: Próxima a cutícula são vistos retículos endoplasmáticos lisos bem desenvolvido. E: Em volta do retículo endoplasmático liso estão vesículas secretoras e o complexo de Golgi. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi, rl=retículo endoplasmático liso, mv=microvilosidades. Escala = 1 μ m.

Figura 4. Imagens de microscopia de transmissão do 3º tarsômero da perna I do macho do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são transversais. A: Próximo a cutícula são encontrados dois reservatórios com vesículas de secreção dentro, que estão próximos a um grande núcleo. B: Detalhe das microvilosidades com grande quantidade de vesículas secretoras. C: Detalhe das vesículas secretoras. D: Retículos endoplasmáticos rugoso estão por toda volta de todas as vesículas secretoras. E: Na cutícula, alguns ductos são visíveis. F: Detalhe de um ducto que está dentro do citoplasma. G: Muitas mitocôndrias estão presentes por todo citoplasma, um ducto é visto com secreções. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi, du=ducto, mv=microvilosidades, rs=reservatório. Escala = 1μm.

Figura 5. Imagens de microscopia de transmissão do metatarso da perna IV da fêmea do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são longitudinais. A: Próximo a cutícula são encontradas algumas vesículas de secreção e algumas mitocôndrias. B: Vesículas secretoras estão por toda a extensão da perna, sempre adjacentes a cutícula. C: Poucos e curtos retículos endoplasmáticos rugosos são encontrados com um complexo de Golgi próximo. D: Poucas mitocôndrias são encontradas no citoplasma. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi. Escala = 0,5μm.

Figura 6. Imagens de microscopia de transmissão do metatarso da perna IV do macho do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são longitudinais. A: Entre as vesículas secretoras, é encontrada uma abundância de retículo endoplasmático rugoso. B: Núcleos com formas irregulares são encontrados com facilidade nas células secretoras. C: Próximos aos núcleos são encontramos frequentemente complexo de Golgi, retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias. D: Entre os retículos endoplasmáticos rugosos são vistas inúmeras mitocôndrias. E: Próximo a membrana basal, são encontrados microvilosidades que é circundado por mitocôndrias. F: Detalhe da quantidade de mitocôndrias juntas encontradas no citoplasma. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi, mv=microvilosidades. Escala = 0,5 μ m.

Figura 7. Imagens de microscopia de transmissão do metatarso da perna IV do macho do opilião *Progonyleptoidellus striatus*. Todos os cortes são longitudinais. A e C: Ductos no citoplasma ou na cutícula são encontrados com frequência. B: Detalhe de um ducto que ultrapassa a extensão inteira da cutícula. D: Detalhe da grande quantidade de secreção encontrada no citoplasma. E: Reservatório com algumas vesículas secretoras juntamente com algumas mitocôndrias e pedaços do retículo endoplasmático rugoso. F: Retículos endoplasmáticos rugosos são encontrados em volta das vesículas de secreção. Cu=cutícula, mt=mitocôndria, rg=retículo endoplasmático rugoso, vs=vesícula secretora, cg=complexo de Golgi, du=ducto. Escala = 2µm.