Marcella Sobral

Análise morfológica e morfométrica do trato reprodutor
feminino e masculino de duas espécies de
Serracutisoma (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae):
evidências de seleção sexual em machos

São Paulo
2010

Marcella Sobral

**Análise morfológica e morfométrica do trato reprodutor
feminino e masculino de duas espécies de
Serracutisoma (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae):
evidências de seleção sexual em machos**

Tese apresentada ao Departamento de
Zoologia do Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, como requisito
para obtenção do título de Doutora em
Ciências, na área de Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Gnaspini

São Paulo
2010

Sobral, Marcella.

Análise morfológica e morfométrica do trato reprodutor feminino e masculino de duas espécies de *Serracutisoma* (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): evidências de seleção sexual em machos.

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

1. Opiliones. 2. Polimorfismo intra-sexual. 3. Seleção sexual.
4. Espermatecas. 5. Espermatozóides.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Zoologia.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Pedro Gnaspini

Aos meus pais e irmãs, pelo apoio e amor incondicionais.

“What we know is a drop, what we don’t know is an ocean”

Isaac Newton

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin

Agradecimentos

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

À COPEL e ao Parque Estadual Intervales, por autorizarem a coleta dos opiliões e a realização do estudo em suas dependências.

Ao meu orientador, Pedro Gnaspini, pela confiança em mim depositada desde minha iniciação científica e pela orientação nesta tese.

À minha família, por acreditar em minhas escolhas e por estar sempre ao meu lado.

Ao Gabriel, pelo amor e, principalmente, pela paciência durante o final da tese.

Ao Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Ênio, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura, pelas discussões sobre as metodologias e pela amizade.

Às professoras Glaucia Maria Machado-Santelli, Marta Antoniazzi e Sylvia Mendes Carneiro, pela ajuda nas técnicas de microscopia e por permitirem a realização dos experimentos em seus respectivos laboratórios.

Ao professor Adílson Ariza Zacaro, por todas as sugestões e discussões em congressos.

Ao Rodrigo, por todas as discussões com relação a esta tese e pela sincera amizade construída ao longo de todos esses anos.

Às minhas companheiras de laboratório, congressos, trânsito na estrada e viagens a campo, Gi e Marie.

A todos aqueles que (fizeram e) fazem parte do Laboratório de Entomologia e Aracnologia, em especial à Re Andrade.

A todos os integrantes do LAL e aos aracnólogos do Instituto Butantan.

À Carol, Mari e Rafa, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Às minhas queridas japonesas Luce, Marisa, Mary, May e Vivi, simplesmente por serem pessoas essenciais na minha vida.

Aos meus amigos Felipe, Nath, Polonês e Vanessa, pela amizade inquestionável, desde a graduação.

À Renatinha, pela amizade e pela ajuda na estatística, e à Ana Carol.

Ao Bial e ao Pedroca, amigos queridos que esses anos de IB me proporcionaram.

À Carol Taqueda, Helena, Maissá e Vivi, por tornarem os últimos anos da tese muito mais amenos e por serem responsáveis por algumas das melhores lembranças da minha vida acadêmica.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com esta tese e que foram essenciais durante esse processo. Seria impossível citar todos nas páginas desta tese.

RESUMO

Machos dos opiliões goniosomatíneos *Serracutisoma spelaeum* e *Serracutisoma guaricana*, cujas fêmeas copulam com mais de um parceiro em um único período reprodutivo, apresentam uma grande variedade morfológica, especialmente relacionada a caracteres sexuais secundários. Considerando-se que machos menores frequentemente perdem disputas por fêmeas, esta tese objetivou verificar possíveis estratégias reprodutivas alternativas, resultantes de seleção sexual pré e pós-copulatória, adotadas por machos de pequeno porte dessas espécies assim como o papel da fêmea nesses mecanismos. Este trabalho foi, então, dividido em três capítulos, cada um com objetivos específicos.

O primeiro deles refere-se à organização do trato reprodutor feminino e caracterização das espermatecas, órgãos de armazenamento de espermatozóides. Imagens de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de varredura associadas às obtidas sob estereomicroscópio revelaram a existência de quatro espermatecas inseridas na musculatura da porção distal do ovipositor. Cada uma delas é constituída por quatro sáculos individuais de fundo cego e se comunica com a luz do ovipositor através de um único canal. A complexidade das espermatecas indica que a fêmea pode ser capaz de armazenar separadamente os espermatozóides dos diferentes machos com os quais vier a copular, enquanto a musculatura ao redor dessas estruturas sugere que ela possa determinar a paternidade de sua progênie através de contrações diferenciais.

O capítulo 2 abrange observações comportamentais e características morfológicas e morfométricas do trato reprodutor masculino, objetivando identificar possíveis estratégias alternativas utilizadas por machos de pequeno porte na obtenção de sucesso reprodutivo. Para tal, foram efetuados acompanhamento do comportamento sexual e estudos morfométricos de genitália e da gônada. Machos de pequeno porte parecem adotar a estratégia de machos-satélites, copulando com as fêmeas quando machos-guardiões estão com a atenção desviada. A ausência de diferenças estatísticas significativas na largura da placa ventral sugere que o pênis de machos grandes e de machos pequenos se ajustam à genitália feminina da mesma maneira e, portanto, sejam

avaliados pelas fêmeas da mesma forma. Já a semelhança no comprimento da genitália e o menor tamanho corpóreo dos machos pequenos indicam que, durante a cópula, eles poderiam alcançar regiões mais profundas da espermateca, removendo ou deslocando os espermatozóides dos outros machos e, conseqüentemente, diminuindo o risco de competição espermática. A análise ultraestrutural dos espermatozóides (compostos por núcleo, citoplasma e acrossomo, além de diversas projeções na superfície) mostrou que, provavelmente, todos os machos possuam espermatozóides viáveis, visto que espermatozóides não-férteis, em geral, não possuem acrossomo. As similaridades entre machos de grande e de pequeno porte tanto na morfologia dos gametas como em seu comprimento indicam que tais características possam ter sido objeto de seleção sexual pós-copulatória.

O terceiro capítulo propõe uma hipótese para a formação das projeções encontradas nos espermatozóides das duas espécies e que lhes confere uma morfologia peculiar. Para isso foi utilizada a associação de três técnicas de microscopia: microscopia eletrônica de transmissão, de varredura e confocal de varredura a laser. Os resultados obtidos evidenciam que essas estruturas são formadas ao longo do processo de espermatogênese. Uma rede de proteínas situada logo abaixo da membrana plasmática exerceria uma pressão sobre o citoplasma, que extravasaria pelos espaços existentes nessa espécie de malha. Dessa forma, as projeções seriam constituídas de citoplasma envolto por membrana plasmática.

Em conclusão, os resultados obtidos na presente tese sugerem que a competição espermática e a escolha críptica da fêmea, componentes da seleção sexual pós-copulatória, são pressões seletivas atuantes nessas duas espécies de opilião.

Morphological and morphometric analysis of the reproductive system of females and males of two species of *Serracutisoma* harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): evidences of sexual selection among males

ABSTRACT

Males of the goniosomatine harvestmen *Serracutisoma spelaeum* and *Serracutisoma guaricana*, which females may copulate with more than one partner during the same reproductive season, show a large morphological variation, especially considering secondary sexual features. Since smaller males frequently lose fights against larger males for females, the present thesis aimed at verifying the occurrence of alternative reproductive strategies among these smaller males as a result of pre- and postcopulatory sexual selection, as well as the role of the female in these mechanisms. This study is composed of three chapters, each one with specific objectives, as described as follows.

The first chapter describes the general organization of the female reproductive system and the spermathecae, structures for the storage of sperm. Light and scanning electronic microscopy images revealed the presence of four spermathecae inserted in the musculature of the distal portion of the ovipositor. Each spermatheca is composed of four individual dead-end sacs and is connected to the ovipositor lumen through a single channel. This complex spermathecae structure indicates that the female is able to store sperm from different males with which she copulates in different places, and that the musculature that involves these structures may be responsible for differential contractions which would result in different paternity for the female's descendants.

The second chapter includes behavioral observations and morphological and morphometric analysis of the male reproductive system (genitalic and gonadal features), aiming at identifying possible alternative reproductive strategies used by small males to achieve reproductive success. Small males seem to adopt a satellite-male strategy, copulating with females when larger guardian-males are not paying attention. The absence of significant statistic differences in the width of its ventral plate suggests that the penis of both large and small males may adjust to the female genitalia in the same

way and, therefore, will be similarly evaluated by the female during copulation. In turn, the smaller length associated to the same sized penis of smaller males in comparison to the larger ones may indicate that they may reach deeper regions of the female genitalia during copulation, possibly removing or displacing the sperm of other males and, in consequence, reducing the risk of sperm competition. The ultrastructure analysis of the spermatozoa (which are composed of a nucleus, cytoplasm and an acrosome, in addition to several surface projections) showed that probably males of different sizes all have viable sperm, since generally non-fertile spermatozoa lack an acrosome. Similarities in the morphology and size of the gametes of both small and large males may indicate that these features have been subjected to postcopulatory sexual selection.

The third chapter suggests a new hypothesis for the development of the projections found in the surface of the spermatozoa of the two species here studied. For this study, three microscope techniques were used: transmission electronic microscopy, scanning electronic microscopy, and confocal laser scanning microscopy. The results show that these projections are formed during the spermatogenesis. A net of proteins situated just below the plasmatic membrane restrains the cytoplasm, which flows through the spaces formed in the net, forming the projections, which are externally limited by plasmatic membrane.

In conclusion, the results obtained in the present study suggest that sperm competition and female cryptic choice, which are components of the postcopulatory sexual selection process, are selection pressures working on the species studied herein.

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO À TESE	
Introdução geral.....	1
Organização da tese.....	10
Materiais e metodologias comuns aos estudos apresentados na tese.....	11
<i>Espécies estudadas.....</i>	11
<i>Áreas de estudo e coletas.....</i>	11
<i>Manutenção em laboratório.....</i>	13
<i>Dissecação e fixação do material.....</i>	14
<i>Microscopia de luz.....</i>	15
<i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	15
<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	16
Referências bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 1: A importância da fêmea na seleção sexual pós-copulatória	
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Materiais e Métodos.....	32
<i>Organização do trato reprodutor feminino.....</i>	32
<i>Descrição e caracterização das espermatecas.....</i>	32
<i>Morfometria do conjunto de espermatecas.....</i>	33
<i>Lista de abreviações.....</i>	34
Resultados.....	35
<i>Organização do trato reprodutor feminino.....</i>	35
<i>Caracterização e organização das espermatecas.....</i>	35
<i>Morfometria do conjunto de espermatecas.....</i>	37
Discussão.....	38
<i>O possível papel da fêmea na seleção sexual.....</i>	38

<i>A função da quitina que reveste parte o canal do ovipositor.....</i>	41
<i>Considerações finais.....</i>	41
Referências bibliográficas.....	43

CAPÍTULO 2: Morfologia e morfometria do aparelho reprodutor masculino e estratégias reprodutivas de machos de pequeno porte

Resumo.....	59
Introdução.....	60
Considerações sobre o período reprodutivo das espécies.....	65
Materiais e Métodos.....	68
<i>Estudo do comportamento reprodutivo.....</i>	68
<i>Organização do trato reprodutor masculino.....</i>	69
<i>Medidas da genitália masculina.....</i>	69
<i>Medidas e histologia dos testículos.....</i>	70
<i>Contagem de espermatozóides na vesícula seminal.....</i>	70
<i>Análise estatística.....</i>	72
<i>Morfologia e ultraestrutura dos espermatozóides.....</i>	72
<i>Lista de abreviações.....</i>	74
Resultados.....	75
<i>Estudo do comportamento reprodutivo.....</i>	75
<i>Organização do trato reprodutor masculino.....</i>	76
<i>Variáveis morfométricas relacionadas à reprodução.....</i>	77
<i>Histologia dos testículos.....</i>	79
<i>Morfologia e ultraestrutura dos espermatozóides.....</i>	80
Discussão.....	82
<i>Possíveis estratégias reprodutivas relacionadas ao comportamento.....</i>	82
<i>A genitália masculina e a seleção sexual pós-copulatória.....</i>	84
<i>Características do trato reprodutor masculino.....</i>	86
<i>Características dos espermatozóides e a seleção sexual pós-copulatória.....</i>	88
<i>Considerações finais.....</i>	89
Referências Bibliográficas.....	91

CAPÍTULO 3: Morfologia dos espermatozóides de *Serracutisoma*

Resumo.....	108
Introdução.....	109
Materiais e Métodos.....	113
<i>Estudo da morfologia dos espermatozóides.....</i>	<i>113</i>
<i>Lista de abreviações.....</i>	<i>115</i>
Resultados.....	116
<i>Estudo da morfologia dos espermatozóides.....</i>	<i>116</i>
Discussão.....	118
<i>Projeções nos espermatozóides de opiliões e outros aracnídeos.....</i>	<i>118</i>
<i>Uma nova hipótese para a formação das projeções.....</i>	<i>119</i>
Referências Bibliográficas.....	121
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 135

INTRODUÇÃO À TESE

Introdução geral

Em 1871, no livro *The descent of man and selection in relation to sex*, Darwin mostrou em uma grande variedade de táxons do reino animal que, especialmente em machos, a presença de algumas características sexuais secundárias poderia ser explicada pela ação da seleção sexual. Diferentemente da seleção natural, que está diretamente relacionada ao êxito tanto dos machos como das fêmeas (Darwin, 1859), a seleção sexual depende do sucesso de certos indivíduos sobre outros do mesmo sexo (Darwin, 1871). Assim, características que conferem vantagens na competição por parceiros seriam selecionadas ao longo do processo evolutivo.

As variações na expressão de características sexuais secundárias são comuns em machos de muitas espécies (Andersson, 1994) e frequentemente se apresentam de forma descontínua, resultando na ocorrência de dois ou mais morfotipos (Gross, 1996). Isto é muito bem representado em besouros, um exemplo clássico de dimorfismo intra-sexual. A existência de machos com chifres e de machos com chifres rudimentares ou ausentes está relacionada com a competição por fêmeas (Moore, 1990; Eberhard & Gutierrez, 1991; Emlen, 1997; Moczek, 1998; Moczek & Emlen, 2000). Como, em geral, a presença de dimorfismos resulta em vantagem para algum dos machos nas disputas por parceiras, em espécies que apresentam dois morfotipos distintos encontram-se também estratégias alternativas para obtenção de cópulas (Fortelius *et al.*, 1987; Cook, 1990; Cook *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1999; Tomkins, 1999). Machos maiores e mais armados atuam como guardiões e têm um maior acesso às fêmeas, enquanto machos menores obtêm cópulas sempre que há oportunidade, assumindo um papel de machos-satélites (Parker, 1990; Gross, 1996). No entanto, uma vez que fêmeas de várias espécies copulam com mais de um parceiro em um mesmo período fértil (Eberhard, 1996), o êxito de um macho na obtenção da cópula não se traduz obrigatoriamente em seu sucesso na fecundação dos ovos, ou seja, em seu sucesso reprodutivo.

Em espécies cujas fêmeas são promíscuas, a disputa pela fecundação continua dentro do trato reprodutor feminino através da competição espermática (Parker, 1970) e/ou da

cryptic female choice (“escolha críptica da fêmea”) (Eberhard, 1996), mecanismos que constituem a seleção sexual pós-copulatória. O primeiro, definido por Parker (1970) como a competição dos espermatozóides de dois ou mais machos pela fecundação de um determinado grupo de ovos, é desde então amplamente reconhecido como uma forma poderosa de seleção sexual (Birkhead & Hunter, 1990). A participação feminina nesse processo, por outro lado, começou a receber especial atenção apenas nas últimas décadas, quando os trabalhos publicados por Eberhard (1985, 1996) demonstraram sua influência no sucesso reprodutivo diferencial dos machos.

A competição espermática é uma forma de seleção sexual pós-copulatória amplamente reconhecida na evolução da biologia reprodutiva de machos e como determinante do sucesso reprodutivo dos mesmos (Gage *et al.*, 2004). Um macho pode diminuir a competição, e consequentemente aumentar sua chance de sucesso reprodutivo, reduzindo a possibilidade de que sua parceira seja inseminada por outros competidores. Uma das principais maneiras para tal é formar com a fêmea as chamadas associações pós-inseminação, divididas por Alcock (1994) em quatro categorias: (1) cópula prolongada, na qual o macho ainda mantém contato genital após a inseminação; (2) tampões copulatórios, que selam ou ocultam o acesso ao trato reprodutor feminino; (3) manutenção do contato com a parceira após a cópula; e (4) monitoramento da mesma, porém sem contato físico. A cópula prolongada e os tampões copulatórios ocorrem normalmente quando a oviposição acontece bastante tempo após a inseminação, constituindo formas mecânicas de se evitar futuras cópulas. Quando a oviposição acontece logo depois da cópula, o monitoramento da parceira é mais utilizado e frequentemente caracterizado por reações vigorosas de rejeição do macho-guardião quando ameaçado por rivais (Parker, 1970). Além disso, machos podem transferir juntamente com os espermatozóides substâncias que diminuam a receptividade da fêmea (Edvardsson & Canal, 2006). No entanto, como mencionado anteriormente, alguns machos podem obter cópulas apesar da presença de machos-guardiões, aumentando a chance de competição espermática no trato reprodutor feminino.

Cada cópula realizada pela fêmea pode reduzir o sucesso reprodutivo dos machos com os quais ela copulou previamente. No díptero *Scatophaga stercoraria* o último macho a copular fecunda cerca de 80% dos ovos, enquanto os espermatozóides de machos das cópulas anteriores competem pelos 20% restantes (Parker, 1970). Fêmeas de muitas espécies são capazes de armazenar os espermatozóides antes da fecundação, o que os torna passíveis de serem manipulados por outros machos em cópulas posteriores (Birkhead & Hunter, 1990). Segundo Parker (1970), machos capazes de deslocar espermatozóides previamente estocados e substituí-los pelos seus teriam uma vantagem seletiva intra-sexual. De maneira geral, o último macho a copular com uma determinada fêmea pode deslocar os espermatozóides dos rivais de duas formas: por estratificação ou por remoção. Na estratificação os espermatozóides do último macho empurram os dos rivais para regiões mais profundas do trato reprodutor feminino, normalmente longe do local onde ocorre a fecundação (Birkhead & Hunter, 1990). Já a remoção pode ser direta, na qual o macho utiliza a própria genitália para isso (Birkhead & Hunter, 1990), ou indireta como, por exemplo, através do uso de fluido seminal para dispersar os espermatozóides anteriores (Radwan & Witalinski, 1991) ou da indução da fêmea para expelir os mesmos.

A principal premissa da teoria da competição espermática é o aumento do investimento na produção de espermatozóides, visando maximizar o sucesso de fecundação (Gage & Morrow, 2003). Estudos comparativos em borboletas (Gage, 1994), morcegos (Hosken, 1997), peixes (Stockley *et al.*, 1997) e moscas (Hosken *et al.*, 2001) demonstraram que existe um aumento do tamanho do testículo conforme o risco de competição, o que indica uma maior produção de espermatozóides e oferece suporte à teoria. O aumento na produção permite a transferência de um número maior de espermatozóides em uma só cópula, ampliando a chance de sucesso reprodutivo (Parker, 1998 *apud* Hinojosa & Thiel, 2003), visto que este está diretamente relacionado à quantidade de espermatozóides no local da fecundação (Cook & Gage, 1995; Eady, 1995; Gage & Morrow, 2003). Diferenças entre machos tanto na habilidade para obter cópulas como na taxa de transferência de espermatozóide podem se traduzir no sucesso

diferencial dos mesmos (Engqvist *et al.*, 2006). Assim, o êxito reprodutivo não estaria relacionado somente à facilidade no acesso às fêmeas, mas também à variação no comportamento de cópula e o posterior sucesso dos espermatozóides na disputa pela fecundação dos ovos.

Diversas peculiaridades dos espermatozóides também têm se mostrado importantes na determinação do sucesso na competição espermática e na seleção sexual pós-copulatória. Assim como a quantidade transferida durante a cópula, o tamanho dos espermatozóides pode ter efeito direto no resultado da competição, tendo sido encontradas em vários táxons relações positivas entre a intensidade da disputa e o tamanho desses gametas (Radwan, 1996; Morrow & Gage, 2001; Gage *et al.*, 2002). Em espécies com espermatozóides flagelados o aumento do comprimento poderia estar relacionado, por exemplo, a uma maior velocidade, o que permitiria uma locomoção mais rápida até o local da fecundação (Birkhead *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 2004). Em salmão, por exemplo, o fator principal na obtenção de vantagem na competição espermática é a velocidade dos espermatozóides, enquanto a quantidade parece não exercer nenhum tipo de influência (Gage *et al.*, 2004). A morfologia e longevidade podem ser influenciadas e sofrer alterações devido a interações com os produtos seminais de outros machos e com o trato reprodutor feminino (Presgraves *et al.*, 1999; Holman & Snook, 2006). Embora algumas alterações sejam apenas resultado do término do processo de maturação, como nos espermatozóides de várias espécies de mosquito (Ndiaye *et al.*, 1997), outras podem ser resultado da seleção pós-copulatória. A seleção sexual favorecerá machos com características que aumentem seu sucesso na competição espermática (Evans *et al.*, 2003).

Além da transferência de gametas, a cópula pode ter como função induzir a fêmea a aceitar e utilizar os espermatozóides transferidos (Eberhard, 1985). Os estímulos fornecidos pelo macho durante a cópula e os produtos seminais liberados na inseminação podem ser sinais para desencadear processos comportamentais e fisiológicos da fêmea necessários para que ele obtenha sucesso na fecundação (Eberhard, 1996). O papel feminino na seleção sexual pós-copulatória, e a consequente prioridade dada a um

macho em detrimento dos outros, é denominado escolha críptica da fêmea (Holman & Snook, 2006). Segundo Birkhead & Møller (1993), o controle da paternidade pela fêmea pode ocorrer em diferentes estágios do processo reprodutivo: antes da cópula (e nesse caso os mecanismos utilizados seriam essencialmente comportamentais, evitando a cópula ou controlando seu tempo de duração), e durante e depois dela. Nestes dois últimos estágios vários mecanismos podem ser utilizados pela fêmea para influenciar a paternidade de seus descendentes (Eberhard, 1996).

Embora as fêmeas sejam sensíveis à quantidade de espermatozóides em seu trato reprodutor (Holman & Snook, 2006), a prioridade é pela qualidade do parceiro (Gage *et al.*, 2002). Machos com produtos seminais considerados de melhor qualidade pela fêmea (Eberhard & Cordero, 1995) ou com genitália cujo formato resulte em estimulação mais efetiva ou se ajuste mais apropriadamente à morfologia genital feminina (Hosken & Stockley, 2004) tendem a ser favorecidos pela escolha críptica da fêmea. Na mosca *Glossina pallidipes*, alterações propositalmente feitas em duas estruturas genitais de um determinado macho e cuja função é pressionar o abdômen da parceira durante a cópula, induziram a escolha da fêmea contra ele: a taxa de armazenamento dos espermatozóides desse indivíduo diminuiu e o número de outras cópulas realizadas pela fêmea aumentou (Briceño & Eberhard, 2009). A morfologia complexa do trato reprodutor feminino também pode influenciar o uso diferencial dos espermatozóides dos competidores, já que a presença de mais de um órgão de armazenamento permite que a fêmea separe espacialmente os espermatozóides de machos rivais e regule a paternidade (Hellriegel & Ward, 1998; Bangham *et al.*, 2003). As fêmeas podem ainda influenciar a paternidade expelindo ou digerindo seletivamente os espermatozóides (Eberhard, 1985; Birkhead *et al.*, 1993), ou utilizando adaptações sutis na fisiologia, como falha na ovulação (impossibilitando a fecundação) e/ou na oviposição (Eberhard, 1996).

Múltiplas cópulas, realizadas tanto por machos como por fêmeas, podem trazer benefícios para os dois sexos. Os machos aumentam as chances de paternidade, enquanto as fêmeas podem obter vantagens com a competição espermática iniciada dentro de seu trato reprodutor. As vantagens podem ser diretas, como no caso do

aumento da qualidade dos nutrientes provenientes dos fluidos seminais (Eberhard & Cordero, 1995), ou indiretas, transferindo para sua progênie os genes dos melhores machos com os quais copulou (Ball & Parker, 2003; Fisher *et al.*, 2006). Embora a competição espermática e a escolha críptica da fêmea possam atuar individualmente no processo de seleção sexual pós-copulatória, o sucesso reprodutivo diferencial de machos pode ser determinado por uma interação entre os sexos (Miller & Pitnick, 2003), conforme resumido na Figura I.1. Em suma, machos possuem diversas características que podem ser utilizadas na disputa pela paternidade e as fêmeas podem exercer influência no resultado da competição, direcionando a evolução dos aspectos masculinos (Snook, 2005).

Na ordem Opiliones, a terceira maior dentre os aracnídeos (Machado *et al.*, 2007), dimorfismos sexuais podem se apresentar, por exemplo, em diferenças no tamanho e armação de pedipalpos e pernas, e no tamanho e coloração do corpo (Pinto-da-Rocha *et al.*, 2007). Os caracteres sexualmente dimórficos são, em geral, encontrados nos machos e frequentemente utilizados em combates intra-sexuais, como já observado em *Phalangium opilio* (família Phalangidae) (Willemart *et al.*, 2006) e *Neosadocus maximus* (família Gonyleptidae) (Willemart *et al.*, 2009). No entanto, estudos sobre variações morfológicas intra-sexuais são raros no grupo. Um dos poucos realizados até o momento demonstra a existência de dois morfotipos de machos em *Serracutisoma proximum* (família Gonyleptidae) em relação ao comprimento das pernas II (Buzatto, 2008). Essas diferenças morfológicas refletem-se também em diferenças no comportamento reprodutivo: machos com pernas II longas defendem os territórios e mais frequentemente vencem disputas por parceiras, enquanto machos com pernas II curtas invadem tais territórios e, em momentos de descuido dos machos maiores, copulam com as fêmeas (Buzatto, 2008). Como mencionado por esse autor, essas cópulas ocasionais aumentam a chance de competição espermática na espécie.

O desenvolvimento pós-embrionário da subordem Laniatores, que compreende a família Gonyleptidae, é dividido em uma fase larval, uma fase ninfal com cinco a sete estádios (Juberthie, 1964, 1965), sendo o último deles denominado subadulto (Muñoz-

Cuevas, 1971), e uma fase adulta. Morfologicamente, os estádios da fase ninfal apresentam características marcadamente distintas das da fase adulta. No ápice das pernas III e IV, por exemplo, as ninfas apresentam um arólio (estrutura que auxiliaria no apoio do animal ao substrato durante a ecdise), ausente nos animais adultos. O número de artículos tarsais (os tarsômeros) é reduzido nas ninfas, variando entre dois e três nos diversos estádios ninfais, enquanto no indivíduo adulto esse número é geralmente superior a uma dezena, podendo ultrapassar duas dezenas dependendo da perna e da espécie analisada (Gnaspini, 1995). Com base em características que indicariam que machos subadultos já teriam capacidade de se reproduzir, Gnaspini *et al.* (2004) propuseram que em Grassatores, uma das infraordens de Laniatores, eles seriam um primeiro estágio da fase adulta. Dessa forma, a fase adulta seria composta por dois estádios, separados apenas pela ocorrência de uma última ecdise. A distinção entre subadultos e adultos seria possível pelo grau de armação dos indivíduos, muito menor nos primeiros (Gnaspini, 1995). No entanto, os próprios autores questionam a possibilidade de machos subadultos serem indivíduos adultos pequenos, ou seja, de que a fase adulta seja composta por um único estágio com grande variação na morfologia (ver também DaSilva & Gnaspini, 2010).

Machos dos opiliões cavernícolas *Serracutisoma spelaeum* e *Serracutisoma guaricana*, ambos da família Gonyleptidae, apresentam grande variação morfológica individual, principalmente no tamanho do corpo e na armação e curvatura do fêmur das pernas IV. Em estudos de campo realizados com *S. spelaeum*, M. C. Chelini (dados não-publicados de seu projeto de Iniciação Científica desenvolvido no mesmo Laboratório) observou que machos maiores e mais robustos, apesar de corresponderem a menos de 40% dos machos da população da caverna, representavam quase 80% dos machos encontrados formando grupos com fêmeas. No entanto, machos menores de *S. guaricana* (e classificados, naquele momento, como “subadultos”) já foram observados copulando (Gnaspini *et al.*, 2004). De forma associada ao estudo de M. C. Chelini (citado acima), opiliões de quinto estágio ninfal dessas espécies foram coletados durante o desenvolvimento do presente estudo. Alguns deles sofreram ecdise em laboratório,

transformando-se em indivíduos com número de artículos tarsais elevado (característico da fase adulta) e que não sofreram nova ecdise nos vários meses que se seguiram. Assim, considerando-se os questionamentos acima e as evidências obtidas durante os dois estudos, concluiu-se que a fase adulta é composta por um único estágio, que não sofre novas mudas, e que é caracterizado, dentre os machos, por uma grande amplitude morfométrica e morfológica. Desse modo, para a realização deste estudo, considerou-se que machos pequenos ou grandes (e que já possuam opérculo genital livre e número de artículos tarsais superior a dez) pertençam à fase adulta.

Considerando-se que machos maiores frequentemente ganham disputas por fêmeas e que machos menores compõem grande parte da população de machos, levanta-se então uma questão importante: que tipo de estratégias eles utilizariam para garantir seu sucesso reprodutivo?

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar se existem mecanismos pré-copulatórios e/ou pós-copulatórios de seleção sexual atuando em opiliões e, especificamente, se machos pequenos possuem características que os proporcionem vantagens reprodutivas sobre os machos maiores, sendo então favorecidos no processo de seleção sexual. Uma vez que, em várias espécies, esse processo inclui a participação ativa da fêmea, objetivou-se também verificar se fêmeas de opiliões poderiam atuar na seleção de espermatozóides. Para tal, foram estudadas duas espécies de opiliões goniosomatíneos (família Gonyleptidae), sendo abordados os seguintes objetivos específicos:

1. Fazer o estudo da genitália feminina e das estruturas envolvidas no armazenamento de espermatozóides de forma a descrevê-las, considerando-se o pouco conhecimento existente na literatura a esse respeito. Uma vez que fêmeas podem copular com mais de um macho em um único período fértil, o entendimento do trato reprodutor feminino visa verificar o potencial papel da fêmea no sucesso reprodutivo dos machos de diferentes tamanhos, ou seja, seu possível papel na competição espermática e seleção sexual pós-copulatória.

2. Verificar se existem estratégias alternativas para obtenção de cópulas e de vantagem na competição espermática, utilizando-se para isso a comparação do

comportamento reprodutivo e de aspectos do trato reprodutor masculino. Tais aspectos incluem também uma análise morfométrica comparativa e de ultraestrutura dos espermatozoides em relação aos diferentes tamanhos de machos. Dessa forma, buscou-se identificar possíveis diferenças entre machos maiores e menores como resultado da seleção sexual pós-copulatória.

3. Adicionalmente procurou-se elucidar a origem das projeções encontradas previamente nos espermatozoides, considerando-se o pouco conhecimento existente na literatura sobre o assunto e o potencial papel da morfologia dos gametas masculinos na competição espermática.

Organização da tese

Com base nos objetivos específicos propostos, a presente tese está estruturada em três capítulos que, apesar de poderem ser tratados individualmente, trazem informações complementares para o estudo de seleção sexual pós-copulatória das duas espécies selecionadas para o trabalho. No capítulo 1 é caracterizado o trato reprodutor feminino. Uma vez que nas últimas décadas diversos estudos mostraram a importância da fêmea no sucesso reprodutivo dos machos, o entendimento da estrutura de seu trato reprodutor é de extrema relevância em estudos de competição espermática, além de contribuir para aumentar o conhecimento acerca de Laniatores. O segundo capítulo apresenta aspectos do comportamento reprodutivo dos machos e as características do trato reprodutor masculino a fim de verificar as potenciais vantagens e/ou desvantagens que machos de diferentes tamanhos possam ter na competição espermática. São apresentadas também a morfologia e ultraestrutura dos espermatozoides. O terceiro e último capítulo foca a morfologia dos espermatozoides e propõe uma hipótese para a origem das projeções encontradas na superfície dos mesmos. Tais estruturas já haviam sido observadas em outras espécies de Laniatores, porém seu processo de formação não foi elucidado até o presente momento. Por fim, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho. As figuras são apresentadas ao final dos respectivos capítulos.

Materiais e Metodologias comuns aos estudos apresentados na tese

Espécies estudadas

A escolha para o presente estudo foi baseada nas espécies utilizadas por Gnaspini *et al.* (2004) para propor a hipótese de que machos subadultos seriam um primeiro estágio da fase adulta, conforme mencionado na Introdução geral. Dentre as espécies citadas pelos autores, optou-se por selecionar aquelas com história natural já bem estudada e cujos machos apresentassem uma variação morfológica acentuada. Foram então escolhidas *Serracutisoma spelaeum* e *Serracutisoma guaricana* (utilizando-se o esquema taxonômico proposto com base na revisão sistemática e análise filogenética recentemente publicadas por DaSilva & Gnaspini, 2010), ambas pertencentes à família Gonyleptidae e referidas anteriormente na literatura como *Goniosoma spelaeum* e *Goniosoma* sp. 2 aff. *badium*, respectivamente. A primeira é uma das espécies de opiliões mais estudadas, tendo sido focados aspectos como reprodução e desenvolvimento pós-embrionário (Gnaspini, 1995), ecologia populacional (Gnaspini, 1996), defesa (Gnaspini & Cavalheiro, 1998), comportamento de forrageio (Santos & Gnaspini, 2002), citogenética (Oliveira *et al.*, 2006) e desenvolvimento embrionário (Lerche, 2009). Já *S. guaricana* foi bastante estudada com relação ao tamanho populacional e características da reprodução, tais como picos reprodutivos e morfologia e tempo de duração dos estádios ninfais (Gnaspini *et al.*, 2004; F. C. Pioker, dados não-publicados referentes ao seu estudo de iniciação científica, desenvolvido no mesmo Laboratório).

Áreas de estudo e coletas

Os exemplares de *S. spelaeum* foram coletados em diferentes cavernas do Parque Estadual Intervales (PEI), reserva de Mata Atlântica localizada ao sul do estado de São Paulo e situada entre as coordenadas 24°12' e 24°32'S e 48°03' e 48°32'W. A região

apresenta clima subtropical úmido, temperatura média anual variando entre 18° C e 19° C e ausência de estação seca (Gnaspini, 1995). O local foi escolhido pela abundância de indivíduos e pela facilidade de acesso às cavernas onde habitam.

A coleta de indivíduos de *S. guaricana* foi efetuada no túnel de manutenção da represa de Guaricana, localizada em Guaratuba, no estado do Paraná. A represa pertence à Companhia Paranaense de Energia e Luz (COPEL) e situa-se nas coordenadas 25° 31'S e 49° 13'W. O túnel onde os opiliões são encontrados possui duas entradas (uma em cada extremidade) e tem cerca de 70 metros de comprimento. As características do ambiente são semelhantes às de uma caverna: ausência de luminosidade e umidade elevada.

Nas duas áreas foram realizadas apenas observações comportamentais, não tendo sido efetuado nenhum estudo de dinâmica populacional durante o presente estudo. As coletas foram feitas manualmente, visando capturar machos em diferentes estágios de desenvolvimento para os trabalhos em laboratório. Para o capítulo 1 foi efetuada a coleta de ninfas de 5º estágio, a fim de se acompanhar seu desenvolvimento e determinar o número de estágios ninfais das espécies. Machos com valores extremos de tamanho corpóreo e armação do fêmur das pernas IV (Figuras I.2 a I.6 e Tabelas I.1 e I.2), foram coletados para os capítulos 2 e 3 desta tese.

Tabela I.1 - Medidas corpóreas referentes a machos de *Serracutisoma spelaeum*. Medidas em milímetros.

Macho	Comprimento de apófise a apófise	Largura do escudo dorsal	Comprimento do escudo dorsal	Comprimento perna II	Comprimento perna III
pequeno porte (n=41)	13,12 ± 1,673	7,5 ± 0,322	7,8 ± 0,425	105,27 ± 7,020	68,94 ± 3,28
grande porte (n=45)	17,13 ± 1,94	8,59 ± 0,667	8,54 ± 0,704	117,38 ± 9,090	73,59 ± 3,059

Tabela I.2 - Medidas corpóreas referentes a machos de *Serracutisoma guaricana*. Medidas em milímetros.

Macho	Comprimento de apófise a apófise	Largura do escudo dorsal	Comprimento do escudo dorsal	Comprimento perna II	Comprimento perna III
pequeno porte (n=27)	13,72 ± 1,748	7,57 ± 0,370	7,59 ± 0,373	92,72 ± 7,841	62,64 ± 4,055
grande porte (n=37)	17,17 ± 2,080	8,69 ± 0,640	8,40 ± 0,486	97,98 ± 7,850	65,44 ± 3,803

Manutenção em laboratório

Os animais coletados para os estudos receberam marcações individuais com diferentes cores de esmalte sintético fosco para aerodelismo e uma marcação relativa à data da viagem em que foram capturados, seguindo metodologia de Gnaspini (1996). As marcas foram efetuadas no escudo dorsal e fêmur das pernas III e IV. Em laboratório, os opiliões foram separados por sexo e acondicionados em caixas grandes de isopor (33 cm de comprimento x 28 cm de altura x 23 cm de largura) com o fundo recoberto por terra umedecida e pedras dispostas de modo a simular frestas. Também foi colocado um fragmento de folha de isopor apoiado em uma das laterais, de modo a formar um abrigo para os opiliões, que normalmente vivem associados a paredes verticais, em geral em locais protegidos. Em cada caixa foram colocados, no máximo, cinco indivíduos. As caixas foram mantidas em uma sala climatizada, com temperatura média em torno de 19°C e umidade relativa do ar de cerca de 85%. Larvas de tenébrio picadas e frutas foram oferecidas, em semanas alternadas, como alimento aos opiliões.

Dissecação e fixação do material

Os machos e fêmeas utilizados para o estudo das características do trato reprodutor foram anestesiados em geladeira por cerca de 20 minutos, a fim de diminuir gradativamente seu metabolismo. Em seguida, sob estereomicroscópio Leica, os animais foram dissecados imersos em solução fisiológica para inseto preparada de acordo com o protocolo de Nunes *et al.* (2008). A dissecação foi efetuada na região ventral do abdômen com o objetivo de facilitar a visualização e extração dos componentes do trato reprodutor. As estruturas retiradas foram mantidas em solução fisiológica para inseto durante a tomada de imagens e, posteriormente, fixadas em diferentes substâncias, dependendo da finalidade a que seriam destinadas, e analisadas sob diferentes técnicas de microscopia. Para evitar repetições ao longo da tese, os fixadores e as respectivas estruturas fixadas serão mencionados na descrição das técnicas usadas, no texto que se segue. Nele são apresentados os protocolos gerais utilizados para cada tipo de microscopia, sendo apresentados detalhes de possíveis alternativas usadas nos capítulos específicos.

Microscopia de luz

O material a ser observado sob microscopia de luz foi fixado por cerca de meia hora em solução de 2,5% glutaraldeído com 2% paraformaldeído (em tampão cacodilato de sódio a 0,1M em pH 7,2). Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação por uma série crescente de álcool, partindo-se de álcool a 70% até álcool absoluto. Após esse processo, o material passou por banhos de xilol para a retirada do álcool. A peça então foi incluída em parafina e cortada em micrótomo. Foram confeccionadas lâminas com cortes de 7 µm de espessura. Todos os materiais observados em microscopia de luz foram corados com hematoxilina e eosina: os cortes aderidos à lâmina de vidro passam por banhos de xilol para a retirada da parafina e, posteriormente, são hidratados em uma sequência decrescente de álcool; permanecem cerca de quinze minutos em solução de hematoxilina, seguida por lavagem em água corrente e por dois minutos, no máximo, em solução de eosina. O material então sofre nova desidratação antes da colocação da lamínula. As observações foram efetuadas em microscópio óptico Leica e as imagens capturadas através do programa Leica Qwin.

Microscopia eletrônica de transmissão

A preparação dos materiais a serem observados sob microscopia eletrônica de transmissão seguiu o procedimento utilizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, onde os experimentos foram realizados. Após a fixação em 2,5% glutaraldeído com 2% paraformaldeído (em tampão cacodilato de sódio a 0,1M em pH 7,2) por aproximadamente uma hora, foi dada sequência ao protocolo discriminado abaixo:

- uma hora em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M;
- três lavagens em cacodilato de sódio a 0,1M;

- uma hora em solução de acetato de uranila a 0,5% com sacarose a 13,3%;
- lavagem em cacodilato de sódio a 0,1M;
- dois banhos de 10 minutos em álcool a 70%;
- dois banhos de 15 minutos em álcool a 95%;
- três banhos de 15 minutos em álcool absoluto;
- dois banhos de 15 minutos em óxido de propileno;
- um banho de 2 a 3 horas (em rotação) em óxido de propileno + resina (1:1);
- pré-embebição em resina pura Epon à temperatura ambiente (de um dia para o outro);
- inclusão em formas de silicone e permanência em estufa a 60°C durante três dias.

Após a polimerização da resina foram confeccionados cortes ultrafinos de cerca de 70nm de espessura para posterior contrastação do material com citrato de chumbo e acetato de uranila. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, no mesmo laboratório.

Microscopia eletrônica de varredura

Os materiais observados sob microscopia eletrônica de varredura foram fixados em substâncias variando desde álcool a 70% a formaldeído a 4%, visto que todas se mostraram viáveis para esse procedimento. Após a fixação foi realizada uma desidratação iniciada com álcool a 70% e finalizada com álcool absoluto. O material foi então submetido ao ponto crítico, montado em *stub* e banhado em ouro, conforme procedimento padrão realizado no Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP. A análise do material e captura de imagens foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB-USP.

Referências Bibliográficas

- Alcock, J. 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annual Review of Entomology* 39: 1-21.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 599pp.
- Ball, M. A. & Parker, G. A. 2003. Sperm competition games: sperm selection by females. *Journal of Theoretical Biology* 224: 27-42.
- Bangham, J.; Chapman, T.; Smith, H. K. & Partridge, L. 2003. Influence of female reproductive anatomy on the outcome of sperm competition in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 523-530.
- Birkhead, T. R. & Hunter, F. M. 1990. Mechanisms of the sperm competition. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 48-52.
- Birkhead, T. R.; Martínez, J. G.; Burke, T. & Froman, D. P. 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 1759-1764.
- Birkhead, T. R. & Møller, A. P. 1993. Female control of paternity. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 100-104.
- Birkhead, T. R.; Møller, A. P. & Sutherland, W. J. 1993. Why do females make it so difficult to fertilize their eggs? *Journal of Theoretical Biology* 161: 51-60.
- Briceño, R. D. & Eberhard, W. G. 2009. Experimental modifications imply a stimulatory function for male tsetse fly genitalia, supporting cryptic female choice theory. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1516-1525.
- Buzatto, B. A. 2008. Biologia reprodutiva do opilião *Acutisoma proximum* (Arachnida: Opiliones): estratégias alternativas de acasalamento em machos e cuidado parental em fêmeas. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Campinas para obtenção do título de Mestre. 115 pp.

- Cook, D. F. 1990. Differences in courtship, mating and postcopulatory behaviour between male morphs of the dung beetle *Onthophagus binodis* Thunberg (Coleoptera: Scarabaeidae). *Animal Behavior* 40: 428-436.
- Cook, J. M.; Compton, S. G.; Herre, E. A. & West, S. A. 1997. Alternative mating tactics and extreme male dimorphism in fig wasps. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 747-754.
- Cook, P. A. & Gage, M. J. G. 1995. Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36: 261-268.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection. John Murray, London.
- Darwin, C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. John Murray, London.
- DaSilva, M. B. & Gnaspini, P. 2010. A systematic revision of Goniosomatinae (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae), with a cladistic analysis and biogeographical notes. *Invertebrate Systematics* 23: 530-624.
- Eady, R. E. 1995. Why do male *Callosobruchus maculatus* beetles inseminate so many sperm? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36: 25-32.
- Eberhard, W. G. 1985. Sexual selection and animal genitalia. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England. 244 pp.
- Eberhard, W. G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 501 pp.
- Eberhard, W. G. & Cordero, C. 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 493-496.
- Eberhard, W. G. & Gutierrez, E. E. 1991. Male dimorphism in beetles and earwigs and the question of developmental constraints. *Evolution* 45: 18-28.

- Edvardsson, M. & Canal, D. 2006. The effects of copulation duration in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Behavioral Ecology* 17: 430-434.
- Emlen, D. J. 1997. Alternative reproductive tactics and male-dimorphism in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41: 335-341.
- Engqvist, L.; Demokien, G.; Lippmann, T.; Epplen, J. T. & Sauer, K. P. 2006. Sperm transfer and paternity in the scorpionfly *Panorpa cognata*: large variance in traits favoured by post-copulatory episodes of sexual selection. *Ecological Entomology* 32: 372-332.
- Evans, J. P.; Pierotti, M. & Pilastro, A. 2003. Male mating behavior and ejaculate expenditure under sperm competition risk in the eastern mosquitofish. *Behavioral Ecology* 14: 268-273.
- Fisher, D. O.; Double, M. C. & Moore, B. D. 2006. Number of mates and timing of mating affect offspring growth in the small marsupial *Antechinus agilis*. *Animal Behaviour* 71: 289-297.
- Fortelius, W.; Pamilio, P.; Rosengren, R. & Lundstrom, L. 1987. Male size dimorphism and alternative reproductive tactics in *Formica exsecta* ants (Hymenoptera, Formicidae). *Annales Zoologici Fennici* 24: 45-54.
- Gage, M. J. G. 1994. Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B* 258: 247-254.
- Gage, M. J. G.; Macfarlane, C. P.; Yeates, S.; Shackleton, R. & Parker, G. A. 2002. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 61: 1528-1539.
- Gage, M. J. G.; Macfarlane, C. P.; Yeates, S.; Ward, R. G.; Searle, J. B. & Parker, G. A. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14: 44-47.

- Gage, M. J. G. & Morrow, E. H. 2003. Experimental evidence for the evolution of numerous, tiny sperm via sperm competition. *Current Biology* 13: 754-757.
- Gnaspini, P. 1995. Reproduction and postembryonic development of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from southeastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Invertebrate Reproduction and Development* 28: 137-151.
- Gnaspini, P. 1996. Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Zoology* 239: 417-435.
- Gnaspini, P. 2007. Development. In: Harvestmen: The Biology of Opiliones. Pp 455-472. Organizadores: Pinto-da-Rocha, R.; Machado, G. & Giribet, G. Harvard University Press, Massachusetts. 507pp.
- Gnaspini, P. & Cavalheiro, A. J. 1998. Chemical and behavioral defenses of a neotropical cavernicolous harvestman: *Goniosoma spelaeum* (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae). *Journal of Arachnology* 26: 81-90.
- Gnaspini, P.; DaSilva, M. B. & Pöker, F. 2004. The occurrence of two adult instars among Grassatores (Arachnida: Opiliones) - A new type of life-cycle in arachnids. *Invertebrate Reproduction and Development* 45: 29-39.
- Gross, M. R. 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 92-98.
- Hellriegel, B. & Ward, P. I. 1998. Complex female reproductive tract morphology: its possible use in postcopulatory female choice. *Journal of Theoretical Biology* 190: 179-186.
- Hinojosa, I. & Thiel, M. 2003. Somatic and gametic resources in male rock shrimp, *Rhynchocinetes typus*: effect of mating potential and ontogenetic male stage. *Animal Behavior* 66: 449-458.
- Holman, L. & Snook, R. R. 2006. Spermicide, cryptic female choice and the evolution of sperm form and function. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1660-1670.

- Hosken, D. J. 1997. Sperm competition in bats. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 385-392.
- Hosken, D. J.; Garner, T. W. J. & Ward, P. I. 2001. Sexual conflict selects for male and female reproductive characters. *Current Biology* 11: 489-493.
- Hosken, D. J. & Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 87-93.
- Lerche, C. F. 2009. Desenvolvimento embrionário em Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores): um estudo comparativo. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. 92+vii pp.
- Machado, G.; Pinto-da-Rocha, R. & Giribet, G. 2007. What are harvestmen? In: Harvestmen: The Biology of Opiliones. Pp. 1-13. Organizadores: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. Harvard University Press, Massachusetts. 507pp.
- Miller, G. T. & Pitnick, S. 2003. Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 114-126.
- Moczek, A. P. 1998. Horn polyphenism in the beetle *Onthophagus taurus*: larval diet quality and plasticity in parental investment determine adult body size and male horn morphology. *Behavioral Ecology* 9: 636-641.
- Moczek, A. P. & Emlen, D. J. 2000. Male horn dimorphism in the scarab beetle, *Onthophagus taurus*: do alternative reproductive tactics favour alternative phenotypes? *Animal Behaviour* 59: 459-466.
- Moore, A. J. 1990. The evolution of sexual dimorphism by sexual selection: The separate effects of intrasexual selection and intersexual selection. *Evolution* 44: 315-331.
- Morrow, E. H. & Gage, M. J. G. 2001. Sperm competition experiments between lines of crickets producing different sperm lengths. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2281-2286.
- Muñoz-Cuevas, A. 1971. Étude du tarse, de l'apotele et de la formation des griffes au cours du développement postembryonnaire chez *Pachylus quinamavidensis* (Arachnida,

- Opiliones, Laniatores). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris* 12: 629-641.
- Ndiaye, M.; Mattei, X. & Thiaw, O. T. 1997. Maturation of the mosquito spermatozoa during their transit throughout the male and female reproductive systems. *Tissue and Cell* 29: 675-678.
- Nunes, P. H.; Bechara, E. G. H. & Camargo-Mathias, E. M. I. 2008. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. *Experimental and Applied Acarology* 45: 199-209.
- Oliveira, R. M.; Zacaro, A. A.; Gnaspini, P. & Cella, D. M. 2006. Cytogenetics of three Brazilian *Goniosoma* species: A new record for diploid number in Laniatores (Opiliones, Gonyleptidae, Goniosomatinae). *Journal of Arachnology* 34: 435-443.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45: 525-567.
- Parker, G. A. 1990. Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. *Proceedings of the Royal Society of London B* 242: 127-133.
- Presgraves, D. C.; Baker, R. H. & Wilkinson, G. S. 1999. Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 1041-1047.
- Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. 2007. Harvestmen: The Biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 597 pp.
- Radwan, J. 1996. Intraspecific variation in sperm competition success in the bulb mite: a role for sperm size. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 855-859.
- Radwan, J. & Witalinski, W. 1991. Sperm competition. *Nature* 352: 671-672.
- Santos, F. H. & Gnaspini, P. 2002. Notes on the foraging behavior of the Brazilian cave harvestman *Goniosoma spelaeum* (Opiliones, Gonyleptidae). *Journal of Arachnology* 30: 177-180.

- Simmons, L.; Tomkins, J. L. & Hunt, J. 1999. Sperm competition games played by dimorphic male beetles. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 145-150.
- Snook, R. R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 46-53.
- Stockley, P. M.; Gage, J. G.; Parker, G. A. & Møller, A. P. 1997. Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *American Naturalist* 149: 933-954.
- Tomkins, J. L. 1999. Environmental and genetic determinants of the male forceps length dimorphism in the European earwig *Forficula auricularia* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47:1-8.
- Willemart, R. H.; Farine, J. P.; Peretti, A. V. & Gnaspini, P. 2006. Behavioral roles of the sexually dimorphic structures in the male harvestman, *Phalangium opilio* (Opiliones, Phalangidae). *Canadian Journal of Zoology* 84: 1763-1774.
- Willemart, R. H.; Osses, F.; Chelini, M. C.; Macías-Ordoñez, R. & Machado, G. 2009. Sexually dimorphic legs in a Neotropical harvestman (Arachnida, Opiliones): ornament or weapon? *Behavioural Processes* 80: 51-59.

Seleção sexual pós-copulatória

Figura I.1: Exemplos de alguns dos mecanismos pós-copulatórios de competição espermática e escolha críptica da fêmea. Adaptado de Snook (2005).

Figura I.2: Macho de pequeno porte de *S. spelaeum*. Escala: 5 mm.

Figura I.3: Macho de grande porte de *S. spelaeum*. Escala: 5 mm.

Figura I.4: Macho de pequeno porte de *S. guaricana*. Escala: 1 mm.

Figura I.5: Macho de grande porte de *S. guaricana*. Escala: 5 mm.

Figura I.6: Medidas obtidas a partir do dorso dos animais. CE: comprimento do escudo dorsal; LE: largura do escudo dorsal; CA: comprimento de apófise a apófise.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no primeiro capítulo desta tese nos permitiram concluir que fêmeas das duas espécies estudadas apresentam quatro espermatecas, inseridas na musculatura da região apical do ovipositor. Cada uma dessas espermatecas é composta por quatro sáculos, que consistem em quatro reservatórios individuais de espermatozóides, e possui apenas uma entrada, voltada para o canal do ovipositor. A presença de espermatecas múltiplas possivelmente permite um armazenamento diferencial de espermatozóides dos diferentes machos com os quais a fêmea tenha copulado, aumentando seu controle sobre a paternidade de sua progênie. A musculatura presente ao redor da região das espermatecas sugere que a fêmea possa controlar a liberação dos espermatozóides através de contrações diferenciais, podendo determinar o sucesso reprodutivo de um determinado macho.

Quanto aos machos, os dados obtidos no capítulo 2 revelaram que o comprimento da genitália, assim como a largura da placa ventral e comprimento do pênis são semelhantes em machos de grande e de pequeno porte. Considerando-se que machos pequenos parecem adotar a estratégia de machos-satélites, ou seja, são capazes de obter cópulas, a ausência de diferenças relacionadas à morfometria das características mencionadas indicam que eles poderiam competir igualmente com machos de grande porte. No entanto, seu tamanho corpóreo reduzido sugere que eles sejam capazes de penetrar regiões mais profundas da espermateca, o que poderia lhes conferir vantagens na competição espermática. A igualdade também encontrada na morfologia e ultraestrutura dos espermatozóides é um indicativo de que tanto machos grandes quanto machos pequenos produzem espermatozóides potencialmente férteis e capazes de obter êxito na fecundação. Com relação à ultraestrutura, os espermatozóides são compostos por um núcleo, que preenche quase todo o interior da célula, um citoplasma dentro de uma invaginação nuclear e um acrossomo situado na região mediana, além de inúmeras projeções em sua superfície.

O último capítulo demonstra que as projeções encontradas nos espermatozoides de machos de grande e de pequeno porte das duas espécies são estruturas originadas no processo de espermatogênese. Tais projeções são constituídas de citoplasma envolto por membrana plasmática, provavelmente resultantes da compressão do citoplasma por uma rede de proteínas logo abaixo da membrana.