**Desenvolvimento embrionário em Gonyleptidae
(Arachnida: Opiliones: Laniatores):
um estudo comparativo**

**São Paulo
2009**

Cristiano Frederico Lerche

**Desenvolvimento embrionário em Gonyleptidae
(Arachnida: Opiliones: Laniatores):
um estudo comparativo**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, pra a obtenção do Título de Doutor
em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Gnaspini

São Paulo

2009

Lerche, Cristiano F.

Desenvolvimento embrionário em Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores):
um estudo comparativo

92 p.

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

1. Desenvolvimento Embrionário 2. Morfologia 3. Opiliones I.
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Pedro Gnaspini

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a)

I. Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao responsável por minha formação acadêmica e profissional, sem o qual não haveria capacidade, maturidade (pessoal e profissional) ou conhecimento, qual para a confecção deste documento quanto para a (possível) obtenção do título de Doutor em Zoologia; o mentor e amigo, orientando minha vida desde 1995, por quem tenho admiração e respeito ímpares, Pedro Gnaspini. Obrigado pela paciência e pelo respeito, pela dureza (quando necessária) e pela compreensão (mesmo quando imerecida), e por tantos anos de amizade e ensinamento, durante todo o meu amadurecimento pessoal e profissional (ambos em lento processo).

Meu grandessíssimo obrigado a todo o pessoal de Intervalos (os quais eu deveria citar por nomes, mas receio que seria acusado de tentar aumentar o volume da tese indevidamente), que sempre me receberam com tanto carinho e gentileza: fui (e sou) acolhido como filho da terra, uma honra a que muitas vezes desejei poder pleitear!

Pela ajuda na preparação dos materiais e pela disponibilidade de acesso, pelas conversas alegres e pelas tardes mais rápidas nas bancadas, muito obrigado ao grande Ênio Mattos: as seqüências de “desidratação, inclusão, carbonização, hidratação, coloração, ...” não foram em vão!

Muitíssimo obrigado à professora Toshie Kawano, que incentivou o projeto desde sua concepção e estimulou meu interesse pelo estudo do desenvolvimento de embriões, sempre solícita e carinhosa.

Grandes e sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Glauco Machado e ao Prof. Dr. Ricardo Pinto-da-Rocha: obrigado pela disponibilidade e pelas contribuições ao projeto, pelos ensinamentos em aracnologia livremente compartilhados e pelas experiências trocadas nestes anos de trabalho.

Aos amigos e colegas do LEA, obrigado a Gisele, a Marcela, a Marie-Claire e ao Pirata (L_A), ao Bruno e ao Musgo (LE_): dividimos espaços e experiências, em viagem e no laboratório, e se puderam me agüentar por mais de 4 anos (sem falar no material cedido e nas discussões e ajudas por todo o projeto), realmente merecem minha profunda gratidão!

Aos queridos membros do LAL, especialmente à Timão, ao MBS e ao Teté, pela troca de idéias e pelas diversas “salvas”, pela companhia e pelo bom humor, pelo material e pelos métodos, o meu muito obrigado.

Pelas comunicações altruístas e pelos comentários construtivos, por tantas dicas e informações imprescindíveis, pelos artigos em cima da hora e pela companhia em diversas refeições e noites (que seriam solitárias do contrário): muito obrigado ao Bruno (Buzatto) e ao Gustavo (é o Billy!) – grandes companheiros de estalagem!

Obrigado ao meu irmão Ernesto e sua família, embora distantes sempre presentes, apoiando com otimismo e esperança minhas escolhas e me agraciando com seu carinho desinteressado.

Aos meus grandes amigos Gabão, Maraba, Raulzito e Zé, obrigado pelo apoio e amizade, que deixam momentos difíceis mais suportáveis, dividindo alegrias e tristezas por tanto tempo.

Minha profunda gratidão aos funcionários e ao corpo docente do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, instituição de ensino na qual completei o Bacharelado e o Mestrado (e que, mesmo assim, continuou a me aceitar), e na qual tive a oportunidade de efetuar esta pesquisa de doutoramento: ninguém pode desejar melhor ambiente de estudo ou trabalho!

Gostaria de agradecer à Comissão Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento do projeto através da bolsa de doutoramento (CNPq # 142253/2005-7), e pelo incentivo à formação de pesquisadores em nosso país.

Aos membros e suplentes da banca de avaliação deste documento, agradeço efusivamente pelo tempo e atenção dispensados na leitura do mesmo e na preparação para a defesa, dedicando sua sabedoria para o aprimoramento do conhecimento alheio (no caso, o meu).

Muito obrigado à minha companheira e cúmplice, aquela que rema com as mãos enquanto eu tiro água da canoa, que me apoiou durante todo este projeto sem questionar minha sanidade, me ajudando a mantê-la quando quase a perdia e quase a tomando de mim quando tentava mantê-la, minha amada esposa Renata.

Nunca encontrarei palavras para agradecer aos meus pais, Ingrid e Sieghardt Lerche, nem conseguirei enumerar as ocasiões e formas pelas quais me incentivaram com amor e carinho, me ensinando a ter respeito próprio e a respeitar ao próximo, procurando dar meu melhor com humildade e honestidade. Seu amor e apoio permearam todos os aspectos da minha vida, e se refletem em minha admiração e amor incondicionais por vocês.

II. Resumo

Os primeiros trabalhos em desenvolvimento embrionário de opiliões tiveram início no final do século XIX, enfocando principalmente espécies holárticas, e desde o final da década de 1970 o assunto não foi mais abordado. Visando retomar este tema com um componente comparativo, o presente estudo objetivou a descrição do desenvolvimento embrionário de quatro subfamílias de Gonyleptidae (Opiliones Laniatores), a saber: Caelopyginae (*Ampheres leucopheus*), Goniosomatinae (*Goniosoma proximum* e *Goniosoma spelaeum*), Mitobatinae (*Longiperna zonata* e *Promitobates ornatus*) e Progonyleptoidellinae (*Iporangaia pustulosa*). Dados adicionais obtidos para outras espécies foram incluídos com fins comparativos. O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado através de fotografias digitais diárias de ovos em diversas desovas de cada espécie.

Ovos de ambas as espécies de Goniosomatinae (que apresentam cuidado materno das desovas) são depositados com aproximadamente 1,5 – 1,6 mm, atingindo 2,1 mm em *G. proximum* e 2,3 mm in *G. spelaeum* próximos à eclosão, ao passo que em *A. leucopheus* e *I. pustulosa* (que apresentam cuidado paterno) apresentam 1,13 mm e 1,30 mm logo após a deposição, e 1,35 mm e 1,59 mm próximos à eclosão, respectivamente.

Foram observadas e descritas diferenças entre as espécies estudadas pelo presente, tanto na coloração do vitelo e transparência do córion como em características morfológicas e na sequência de eventos, em especial no padrão de pigmentação.

A duração do período embrionário foi de 29-56 dias em *A. leucopheus*, 35-66 dias em *I. pustulosa*, 31–48 dias em *G. proximum*, 29–54 dias em *G. spelaeum*, 43-64 dias em *L. zonata* e 35-55 dias in *P. ornatus*. Dentre as espécies estudadas a duração relativa de cada fase variou bastante, com a clivagem correspondendo a 3-4% do período embrionário, a formação da banda germinativa a 9-14%, a metamerização do prossoma a 3-13%, a inversão do embrião a 21-38%, a organogênese larval a 22-42% e a fase larval no ovo a 7-28%.

III. Abstract

The first studies concerning the embryonic development of harvestmen started in the late XIX century, mostly concerning holarctic species, and the last studies appeared during the late 1970s. Aiming at filling a gap of more than 30 years in the study of embryology of harvestmen, and adding a comparative component, this study focused on the embryonic development of species of four subfamilies of Gonyleptidae harvestmen (Laniatores), namely Caelopyginae (*Ampheres leucopheus*), Goniosomatinae (*Goniosoma proximum* and *Goniosoma spelaeum*), Mitobatinae (*Longiperna zonata* and *Promitobates ornatus*) and Progonyleptoidellinae (*Iporangaia pustulosa*). Additional data acquired for other species is also included for comparison purposes. The embryonic development was followed in the field, by taking daily photographs of different eggs from a number of egg batches during about two months.

Eggs of both species of the subfamily Goniosomatinae (which present maternal care of batches) are laid with ca. 1.5 – 1.6 mm in diameter, reaching ca. 2.1 mm in *G. proximum* and 2.3 mm in *G. spelaeum* near hatching, whereas recently laid eggs of *A. leucopheus* and of *I. pustulosa* (which present paternal care) have approximately 1.13 mm and 1.30 mm in diameter, respectively, reaching diameters of about 1.35 mm and 1.59 mm, respectively, close to hatching.

Differences concerning yolk coloration and eggshell transparency were observed and are described for the presently studied species, as well as differing morphological features and sequence of events, particularly in reference to the pigmentation pattern.

The duration of the embryonic phase was 29-56 days in *A. leucopheus*, 35-66 days in *I. pustulosa*, 31–48 days in *G. proximum*, 29-54 days in *G. spelaeum*, 43-64 days in *L. zonata* and 35-55 days in *P. ornatus*. Amongst the species studied herein relative durations are quite variable, with cleavage corresponding to 3-4% of the embryonic development, germ band formation to 9-14%, prosoma metamerization to 3-13%, the inversion of the embryo to 21-38%, larval organogenesis to 22-42% and the larval phase in the egg to 7-28%.

Índice

I. Agradecimentos	ii
II. Resumo	iv
III. Abstract	v
IV. Índice	vi
1. Introdução	1
1.1 Desenvolvimento Embrionário	1
1.2 Opiliões	3
1.3 Embriologia de Opiliões	6
1.3.1 Histórico	6
1.3.2 Descrição	8
1.4 Objetivos	10
2. Materiais e Métodos	11
2.1 Espécies Estudadas	11
2.2 Acompanhamento do Desenvolvimento Embrionário	12
2.3 Obtenção de Desovas	12
2.4 Trabalho no campo	12
2.4.1 Área de Estudo	12
2.4.2 Viagens de Observação e Coleta	13
2.4.3 Acompanhamento dos Embriões no Campo	13
2.5 Trabalho no laboratório	14
2.5.1 Obtenção de desovas no laboratório	14
2.5.2 Análises Histológicas e Microscopia Eletrônica de Varredura	14
2.6 Descrição da morfologia embrionária	15
2.7 Estrutura das Desovas e Sobrevivência dos Ovos	16
2.8 Volume dos Ovos e Aumento Relativo	16
Tabela e Figuras	17

3 Resultados	19
3.1 Estrutura das Desovas e Sobrevivência dos Ovos	19
3.2 Aumento Volumétrico dos Ovos	19
3.3 Desenvolvimento Embrionário em Caelopyginae e Progonyleptoidellinae	20
3.4 Desenvolvimento Embrionário em Goniosomatinae	21
3.5 Desenvolvimento Embrionário em Mitobatinae	24
3.6 Observações Complementares	25
3.7 Análise Comparada da Temporização do Desenvolvimento Embrionário	26
Tabelas e Figuras	28
4 Discussão	36
4.1 Estrutura das Desovas e Redução de Ovos	36
4.2 Aumento Volumétrico dos Ovos	37
4.3 Padrões de Desenvolvimento Morfológico	37
4.4 Temporização	39
4.5 Considerações Finais	42
5 Conclusões	43
6 Literatura Citada	45
Anexo 1 - Embryonic development of <i>Ampheres leucopheus</i> and <i>Iporangaia pustulosa</i> (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae)	50
Anexo 2 - Embryonic development in Goniosomatinae harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae) from Brazil	76

1 Introdução

1.1 Desenvolvimento Embrionário

Nos animais multicelulares, o hiato entre a fertilização do óvulo e o nascimento do animal constitui o período embrionário. No início deste período o ovo fertilizado, ou zigoto, sofre sucessivas divisões mitóticas, em um processo sujeito à regulação genética, denominado clivagem (Gilbert 1995).

Dentre os diversos grupos animais, diferentes tipos de clivagem podem ocorrer, dependendo principalmente da quantidade e localização do vitelo no ovo e de fatores citoplasmáticos que influenciam o ângulo e ritmo de formação do fuso mitótico (Bowder et al 1991). A quantidade e localização do vitelo determinam em que porção do zigoto ocorrerão as primeiras divisões mitóticas, bem como o tamanho relativo das células formadas por estas divisões, denominadas blastômeros. Desse modo, essencialmente dois tipos de clivagem foram reconhecidos, a clivagem completa ou holoblástica, na qual o sulco de clivagem estende-se através de todo o ovo, e a clivagem incompleta ou meroblástica, na qual somente parte do citoplasma do zigoto sofre clivagem (Gilbert 1995).

A clivagem completa ocorre em ovos com pouco vitelo, e em duas situações distintas: ovos com vitelo escasso e distribuído uniformemente, denominados isolécitos ou oligolécitos, e ovos em que uma pequena quantidade de vitelo concentra-se em um dos pólos do ovo, denominados mesolécitos (ou moderadamente telolécitos). Nesses casos, a sobreposição dos fatores de formação do fuso mitótico sobre a ação repressora do vitelo pode ser observada, resultando em diferentes padrões de clivagem. Ovos mesolécitos ocorrem em todos os grupos de anfíbios, e a simetria da clivagem de tais ovos é radial; em ovos oligolécitos, entretanto, a clivagem é fortemente influenciada pela formação dos fusos mitóticos, e a clivagem de tais ovos pode ter simetria radial (como nos equinodermos), espiral (nos anelídeos, platelmintos, nematelmintos e na maioria dos moluscos), bilateral (nas ascídias) ou rotacional (nos mamíferos) (Gilbert 1995).

Ovos com grande quantidade de vitelo apresentam clivagem incompleta, e neste caso o vitelo pode estar localizado densamente em um dos pólos dos ovos, sendo estes denominados telolécitos, ou centralizado no interior dos ovos, sendo estes chamados então de centrolécitos. A clivagem de ovos telolécitos pode ter simetria bilateral - como observado nos moluscos cefalópodes - ou rotacional, uma forma específica de clivagem bilateral observada nos grupos de "répteis", peixes e aves; ovos centrolécitos apresentam clivagem superficial, sendo a forma observada para a maior parte dos grupos de artrópodes (Gilbert 1995).

Como mencionado, ovos centrolécitos apresentam grande quantidade de vitelo em posição central, sendo este envolvido por uma fina camada de periplasma, por sua vez envolta pela membrana vitelínica e, externamente, o córion produzido pelo útero materno. O núcleo zigótico situa-se entre o vitelo e o periplasma, circundado por uma porção de citoplasma não isolada por uma membrana celular. Este tipo de estrutura do ovo dá origem, como discutido, a uma forma de clivagem conhecida como meroblástica superficial, na qual o núcleo sofre uma série de divisões mitóticas originando grande número de cópias sem formar membranas celulares, e tais núcleos migram, recobrando o vitelo em uma fina camada, formando a chamada blastoderme sincicial (Daly et al 1998). Estudos efetuados com *Drosophila* sp. sugerem que até este momento todos os processos são controlados por produtos gênicos maternos, sendo que somente após a formação da blastoderme sincicial tem início a atuação dos genes do embrião. A formação de membranas celulares envolvendo os núcleos e parte da matriz citoplasmática dá origem à chamada blastoderme celular, na qual uma camada única de blastômeros envolve o vitelo (Gilbert 1995).

A etapa seguinte no desenvolvimento dos embriões é a gastrulação, momento em que as células originadas no processo de clivagem migram para formar camadas celulares organizadas, os folhetos germinativos, e a gástrula formada por este processo apresenta duas camadas germinativas (Bowder et al 1991). Nos metazoários com simetria bilateral, assim como em alguns de simetria radial (como os ctenóforos), uma terceira camada germinativa surge entre a ectoderme, a camada celular externa, e a endoderme, a camada interna. Este folheto germinativo recebe o nome de mesoderme, e sua origem e forma de segregação variam dentre os diversos grupos de metazoários (Gilbert 1995).

A formação da banda germinativa nos artrópodes ocorre no início da gastrulação, com um engrossamento da camada de blastômeros ventralmente na linha mediana, formando uma camada de células “colunares” que constituem o sítio germinativo, ao passo que as demais células blastodérmicas formam uma fina membrana envolvendo o vitelo. Ao mesmo tempo, ocorre a migração das células sexuais da região posterior para o sítio germinativo, e em seguida a porção membranosa da blastoderme se diferencia na serosa e no âmnio, cobrindo o vitelo e se dobrando de forma a envolver a banda germinativa em formação (Yoshikura 1975).

Embora a ectoderme e a endoderme constituam tecidos epiteliais assim que são formados, a mesoderme pode ou não ter organização epitelial, e o modo de segregação da mesma tem relação direta com a estrutura e formação da cavidade celomática. A mesoderme epitelial origina-se sob a forma de desdobramentos da parede do arquêntero, que posteriormente se destacam formando um compartimento

celomático independente, por um processo denominado enterocelia, tendo portanto origem endodérmica. Uma mesoderme não-epitelial, também chamada de mesênquima, pode ter origem ectodérmica ou endodérmica, e é constituída por células independentes localizadas na blastocele ou, na ausência de uma, comprimidas entre a ectoderme e a endoderme. Em animais nos quais a mesoderme está destinada a formar um celoma (celomados) esta aparece sob a forma de um mesênquima para posteriormente se diferenciar no epitélio celomático (Gilbert 1995).

Uma vez estabelecidas as camadas germinativas, tem início a organogênese (ou morfogênese), um complexo processo que envolve a migração e interação das células dos folículos embrionários na formação dos tecidos e órgãos do animal (Gilbert 1995). A diferenciação das células das camadas germinativas durante a morfogênese é extremamente específica, e foi bastante conservada ao longo da evolução dos metazoários. Assim, cada folículo embrionário originado na gastrulação se diferencia em um epitélio dos adultos: a ectoderme dá origem à epiderme, a mesoderme se diferencia em mesotélio e a endoderme se torna a gastroderme (Bowder et al 1991). A epiderme envolve o corpo secretando a cutícula, e grande parte do sistema nervoso surge da camada epidérmica, e por vezes está restrito à mesma. O mesotélio se alinha com o celoma e forma a musculatura, o tecido conjuntivo (ossos, tendões, etc.), as células sangüíneas e diversos órgãos (como o coração e os rins), e em conjunto com os gametas, as gônadas. A gastroderme produz o revestimento do tubo digestivo e seus órgãos associados (pâncreas, fígado, etc.) (Gilbert 1995).

1.2 Opiliões

A ordem Opiliones inclui aracnídeos caracterizados pela fusão parcial entre o prossoma e o opistossoma, pela presença de um par de glândulas repugnatórias na lateral anterior do corpo, e pela existência de um pênis, nos machos (para transferência de espermatozóides diretamente para a abertura genital feminina), e de um ovipositor, nas fêmeas (para postura dos ovos sobre ou dentro do substrato) (Shultz & Pinto-da-Rocha 2007). Opiliões geralmente são encontrados em ambientes úmidos, e têm sido considerados como onívoros com tendências predatórias, tendo os mais variados itens sido observados em sua dieta: animais vivos (diretamente capturados ou adquiridos de outros predadores), restos de animais mortos e em decomposição, fungos e até material vegetal (Hillyard 2005).

São reconhecidas atualmente quatro subordens: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi e Laniatores (Giribet et al 2002), embora algumas vezes Eupnoi e Dyspnoi sejam reunidos na subordem Palpatores (Shultz 1998), ou os Cyphophthalmi e os Palpatores reunidos na subordem Cyphopalpatores (Martens 1976; Martens et al 1981).

Cyphophthalmi é um grupo pequeno (um pouco mais de 100 espécies) de opiliões de porte reduzido semelhantes a ácaros, de ocorrência esparsa pelo mundo. As ordens Eupnoi e Dyspnoi incluem aproximadamente 2500 espécies registradas por todo o planeta, mas concentradas na região temperada holártica. A subordem Laniatores apresenta cerca de 3800 das 6000 espécies descritas para a ordem, também distribuídas por todo o globo, mas concentradas nas regiões tropicais, sendo particularmente especiosos na região neotropical (Machado et al 2007, Shultz & Pinto-da-Rocha 2007, Giribet & Kury 2007).

Como esperado, a maior parte dos estudos em desenvolvimento de opiliões considerou espécies das subordens Eupnoi e Dyspnoi do hemisfério norte (Pinto-da-Rocha et al 2007), sendo que os Laniatores, especialmente da região neotropical, somente a partir da década de 1990 têm sido estudados mais detalhadamente, porém com grande intensidade (Gnaspini 1995, 1996; Machado & Oliveira 1998, Machado & Raimundo 2001, Willemart 2001, Machado 2002, Hara et al 2003; Gnaspini et al 2004, Machado et al 2004, Willemart & Gnaspini 2004). Até há pouco tempo, somente 35 espécies (2 Cyphophthalmi, 11 Eupnoi, 12 Dyspnoi e 10 Laniatores) foram o foco de estudos ontogenéticos. Recentemente, entretanto, foi publicado um compêndio das informações conhecidas acerca da ordem Opiliones (Pinto-da-Rocha et al 2007), incluindo um resumo dos conhecimentos acerca dos embriões e seu desenvolvimento nas espécies desta ordem (Gnaspini 2007).

O ciclo de vida dos opiliões compreende, basicamente, duas fases distintas: o período embrionário, cujo desenvolvimento ocorre dentro do ovo, e a fase pós-embrionária, que tem início logo após a saída da larva e segue até o final da vida do aracnídeo. Por sua vez, o desenvolvimento pós-embrionário pode ser dividido nas fases larval, ninfal e adulta. A larva emerge do ovo e muda para o primeiro ínstar ninfal, e a fase adulta é atingida após um número variável de ecdises (Gnaspini 2007).

Com exceção dos Cyphophthalmi, nos quais a transferência de esperma parece se dar por meio de um espermatóforo depositado no substrato por um espermatorpositor (Karaman 2005), os demais representantes da ordem Opiliones apresentam um órgão exclusivo para a transferência direta de esperma (o pênis), como mencionado (Shultz & Pinto-da-Rocha 2007). A fertilização dos ovos em opiliões ocorre na saída do ovipositor no momento da deposição dos ovos, tendo início então o desenvolvimento do embrião (Machado & Macías-Ordóñez 2007). Embora em geral não exista micrópila em aracnídeos (sendo a fertilização do ovo anterior à formação do córion e da membrana vitelina), Hölm (1947) observa que *Opilio parietinus* apresenta uma estrutura que descreveu como sendo “muito provavelmente uma micrópila”.

O local de deposição dos ovos varia de acordo com a morfologia do ovipositor, sendo que as fêmeas dos Eupnoi, que apresentam ovipositor longo, depositam seus ovos em buracos e frestas de troncos e rochas (Immel 1955, Juberthie 1964, Tischler 1967) enquanto que representantes das subordens Dyspnoi e Laniatores aderem seus ovos ao substrato aberto [folhas, troncos, rochas, etc.] (Juberthie 1965, Avram 1973, Gnaspini 1995, 1996, Willemart 2001, Machado et al 2004, Willemart & Gnaspini 2004). Ademais, enquanto algumas espécies depositam ovos isolados em locais afastados entre si em diversos eventos de oviposição (Willemart 2001), outras depositam seus ovos em grande quantidade em desovas aglomeradas (Gnaspini 1995, Machado et al 2004). Algumas espécies depositam desovas cobertas por muco, enquanto em outras este não está presente, e os ovos podem estar soltos ou enterrados no substrato (Immel 1955), aderidos a superfícies ou ainda em partes ocas de plantas (criadas por insetos) e outras cavidades naturais (Tischler 1967).

Nos Laniatores, espécies que depositam ovos isolados por vezes cobrem os ovos parcialmente com detritos e os abandonam (o que parece ser a condição plesiomórfica para a subordem) (Willemart 2001), enquanto que as espécies que depositam grandes desovas em geral apresentam alguma forma de cuidado parental (Gruber 1993, Ramires & Giaretta 1994, Gnaspini 1996, Machado & Oliveira 1998, Machado 2002, Machado & Macías-Ordóñez 2007). Nessas espécies, um dos pais permanece no local de oviposição cuidando dos ovos até sua eclosão e, muitas vezes, até que as ninfas dispersem. Geralmente, o cuidado é efetuado pela fêmea, podendo o macho se retirar imediatamente após a cópula ou permanecer junto à fêmea até a deposição dos ovos (possivelmente como garantia de paternidade) (Gnaspini 1995; Machado & Raimundo 2001; Willemart & Gnaspini 2004). Existem alguns casos registrados de cuidado paterno, entretanto, nos quais o macho seleciona um local de cópula que já servirá de sítio para a desova, e nestes casos a fêmea abandona a área logo após a deposição dos ovos enquanto o macho permanece guardando os mesmos, tendo sido sugerido que a presença e quantidade de ovos serviriam como atrativo para outras fêmeas (Hara et al 2003; Machado et al 2004).

O número de desovas que uma fêmea deposita em sua vida, bem como o número de ovos por desova, variam inclusive entre espécies de um mesmo grupo taxonômico. Em *Goniosoma spelaeum*, não foram observadas duas deposições de ovos por uma mesma fêmea (Gnaspini 1995), e Machado & Oliveira (1998) notaram que raramente uma fêmea de *Goniosoma longipes* põe ovos mais de uma vez durante sua vida, enquanto Willemart & Gnaspini (2004) observaram diversas fêmeas de *Goniosoma albiscryptum* que depositaram ovos duas vezes e, inclusive, algumas que puseram ovos três vezes em sua vida.

1.3 Embriologia de Opiliões

1.3.1 Histórico

Balbani (1872) foi o pioneiro na embriologia de opiliões, examinando uma espécie indeterminada que ele denominou *Phalangium*. Embora tenha descrito os ovos iniciais e apresentado figuras de embriões nas fases finais e de larvas, trata-se de uma extensa descrição da morfologia de opiliões, sendo apenas parte referente à embriologia, e ainda assim só à fase final do desenvolvimento embrionário. Quatorze anos depois, Henking (1886) publicou a primeira parte de um artigo sem continuação, também com uma espécie não-identificada, mas não descreveu com detalhes a embriologia dos animais, e sua principal contribuição foi a de notar que os ovos aumentam em volume, por absorção de água, no início do período embrionário. Embora de pouca relevância no conhecimento atual sobre o desenvolvimento embrionário de opiliões, estes estudos resultaram no surgimento de uma linha de pesquisas que floresceu na década de 1890, com os trabalhos de Jaworowski (1891), Faussek (1888, 1891, 1892), Purcell (1892) e Schimkewitsch (1898).

Jaworowski (1891) comparou a formação e desenvolvimento dos apêndices em alguns aracnídeos e insetos, sem comentários específicos sobre opiliões exceto a inclusão de *Phalangium* no grupo de estudo. Faussek (1888, 1891) referiu-se à espécie que trabalhou como *Phalangium cornutum*, e descreveu a formação da placa genital a partir dos folhetos germinativos e alguns aspectos da clivagem e formação da banda germinativa, tendo traduzido seu próprio trabalho no ano seguinte para o inglês (Faussek 1892). Com um enfoque mais específico, Purcell (1892) descreveu a construção dos olhos em embriões de um opilião que denominou *Leiobunum hemisphaericum*. O trabalho de Schimkewitsch (1898) compilou os conhecimentos sobre o assunto até então, além de descrever brevemente o desenvolvimento do sistema digestivo de alguns aracnídeos. Após este período, quase cinco décadas se passaram antes que o estudo do desenvolvimento embrionário em opiliões fosse retomado.

O primeiro estudo mais detalhado do desenvolvimento embrionário em opiliões foi conduzido por Hölm (1947) com *Opilio parietinus* (De Geer 1778) (Phalangidae, Eupnoi), apresentando figuras detalhadas de diversos estágios, porém tratando do processo de desenvolvimento de uma forma contínua e sem grande preocupação em classificar etapas. Pabst (1953) estudou a biologia de diversos Trogulidae (Dyspnoi) da Europa meridional, traçando alguns comentários sobre deposição e tamanho de ovos e duração do período embrionário. Dois anos depois, Immel (1955) discutiu a biologia reprodutiva de *Platybunus bucephalus* (C.L. Koch 1835) (Phalangidae, Eupnoi), com algumas considerações sobre a embriologia da espécie. Em seguida,

Pfeifer (1956) trabalhou com a ecologia e a sistemática larval de opiliões, e a parte referente à embriologia discute principalmente condições de manutenção dos ovos e tempos de eclosão, bem como a morfologia larval dos grupos. No ano seguinte, em um artigo belamente ilustrado, Winkler (1957) discorreu detalhadamente sobre as mudanças na morfologia externa em embriões de *Phalangium opilio* Linnaeus 1758 e *Lacinius ephippiatus* (C.L. Koch 1835) (Phalangiidae, Eupnoi), bem como sobre o desenvolvimento das cavidades celomáticas, do sistema nervoso, da musculatura e do coração, além do processo de formação da boca e das quelíceras. Ainda no mesmo ano, Moritz (1957) publicou uma extensa descrição das mudanças na morfologia externa durante o desenvolvimento embrionário em *Platybunus triangularis* Herbst (Phalangiidae, Eupnoi), bem como da formação do intestino médio e do esboço genital. Este autor publicou também uma continuação (Moritz 1959), descrevendo detalhadamente a formação da glândula coxal em *Phalangium opilio*, com ilustrações de sua estrutura e histologia.

Em 1960, Juberthie mostrou a ação da temperatura sobre a mortalidade e duração do desenvolvimento embrionário em *Odiellus gallicus* Simon 1879 (Phalangiidae, Eupnoi). Em trabalhos subseqüentes, esse autor incluiu ainda descrições detalhadas do desenvolvimento embrionário em *O. gallicus*, o qual dividiu em 5 fases, e discutiu suas diferenças em relação ao desenvolvimento dos embriões em outras espécies (Juberthie 1964, 1965). Cabe ainda mencionar, na década de 1960, o trabalho de Tischler (1967) com *Mitopus morio* (Fabricius 1799) (Phalangiidae, Eupnoi), descrevendo o local de desova, a influência da temperatura na mortalidade dos ovos e duração do período embrionário e presença de diapausa em ovos de inverno.

A primeira espécie da subordem Laniatores a ter sido estudada em detalhes foi *Pachylus quinamavidensis* Muñoz 1969 (Pachylinae Gonyleptidae), por Muñoz-Cuevas (1971), utilizando o esquema de subdivisão proposto por Juberthie (1964) para descrever as etapas do desenvolvimento embrionário. Este autor ainda publicou uma análise comparativa do desenvolvimento de embriões de *P. quinamavidensis* com os de alguns anelídeos e outros artrópodes, discutindo aspectos histológicos e anatômicos (Muñoz-Cuevas 1973). Ainda em 1973, Avram publicou um artigo sobre o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de *Paranemastoma silli* (Herman) (Nemastomatidae, Dyspnoi), no qual comenta sobre a postura dos ovos e descreve sucintamente o desenvolvimento dos embriões.

Compilando conhecimentos da literatura, Anderson (1973) comparou o desenvolvimento embrionário de aracnídeos, incluindo opiliões, ao de anelídeos e outros artrópodes, enquanto Yoshikura (1975) resumizou e comparou os

conhecimentos sobre embriologia em aracnídeos. Esta é a base que forma o vulto do conhecimento atual sobre o desenvolvimento embrionário na ordem Opiliones.

1.3.2 Descrição

O tamanho dos ovos varia entre grupos e até mesmo espécies, estando geralmente entre 0,5 mm e 2,3 mm. No início da fase embrionária os ovos crescem em tamanho e peso, absorvendo a água do ar (necessitando, portanto, de alta umidade relativa) e/ou do muco que rodeia os ovos [quando for o caso] (Henking 1886; Immel 1955; Juberthie 1964, 1965).

Há discrepâncias nos esquemas de subdivisão do período embrionário propostos na literatura (Hölm 1947; Winkler 1957; Juberthie 1964; Muñoz-Cuevas 1971), e enquanto o trabalho de Hölm parece tratar do processo de desenvolvimento de uma forma contínua, o trabalho de Winkler se destaca por dividir o período embrionário em 7 etapas (A – G, sendo a última a fase larval), em contraposição às cinco etapas descritas por Moritz (1957, 1959) e Juberthie (1960, 1964, 1965). Uma vez que a organogênese larval é a última fase do desenvolvimento embrionário, alguns autores (C. Juberthie, A. Muñoz-Cuevas e colegas) preferiram considerar a fase embrionária como terminando com a formação da larva ainda dentro do ovo e com o início dos batimentos cardíacos (e.g., Muñoz-Cuevas 1971). Desse modo, a fase larval ainda dentro do ovo, considerada por alguns autores como uma sexta etapa do desenvolvimento embrionário, pode durar dias.

Balbiani (1872) já descreveu o ovo inicial, no qual o zigoto é circundado por duas membranas: um córion delgado, no exterior, e uma membrana vitelina mais grossa, interiormente. A clivagem (Fase I, segundo Juberthie 1964) em opiliões é superficial, e descrições da literatura incluem a formação de uma blastoderme celular a partir de uma massa germinativa íntegra com cerca de oito núcleos dispersos, o surgimento da ectoderme por delaminação e a formação da endoderme a partir das células da blastoderme, os espaços “ocos” presentes durante todo o desenvolvimento embrionário (Faussek 1891; Hölm 1947). Foi observado um engrossamento secundário da membrana vitelínica pela formação de uma nova camada cuticular secretada pela ectoderme, seguido do surgimento, pela multiplicação das células ectodérmicas, do disco germinativo no pólo vegetal do embrião. Como a nova camada de células basais representa a mesoderme, esta tem origem ectodérmica (Faussek 1892). A formação da banda germinativa (Fase II, segundo Juberthie 1964) não foi elucidada em termos estruturais, tendo sido observada em alguns casos como o surgimento de uma pequena mancha alongada na periferia da blastoderme (Hölm 1947, Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971).

Em seguida, na fase de metamerização do prossoma (Fase III, segundo Juberthie 1964), ocorre a condensação de material celular na face ventral do embrião, com o aparecimento, sob a forma de protuberâncias pares (em número de seis), dos primórdios apendiculares do prossoma (Hölm 1947, Winkler 1957). Após isso, formam-se as placas cefálica e anal, respectivamente nas regiões anterior e posterior do embrião. Durante esta etapa ocorre também a segmentação do embrião em 6 somitos, os somitos do prossoma (Juberthie 1964; Muñoz-Cuevas 1971).

Na fase de inversão do embrião (Fase IV, segundo Juberthie 1964) aparecem os somitos abdominais e se formam as pregas oculares, e começa a aparecer, sob a forma de elevações ventrais pares em cada metâmero, o sistema nervoso. As quelíceras aproximam-se da linha médio-anterior, e entre as mesmas se origina o orifício bucal. Os apêndices atingem desenvolvimento total e em suas extremidades formam-se as garras, tendo início o processo de pigmentação do embrião. Como consequência da inversão do embrião, ocorre um reforçamento da parte médio-ventral dos primeiros esternitos nos primórdios das pernas III e IV, e o primórdio da placa genital é deslocado para frente (Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971).

A fase da organogênese larval (Fase V, segundo Juberthie 1964) inclui a formação do ceco digestivo e a diferenciação dos olhos e do coração, bem como um aumento gradual da pigmentação dos tecidos. Nesta etapa o sistema nervoso desenvolve-se, a partir de um leve estreitamento nos artículos, e se concentra originando os gânglios supra e subesofágicos (Muñoz-Cuevas 1971). Quando presente na espécie, é nesta fase que se forma, no centro do prossoma entre as quelíceras, o dente de eclosão (Immel 1955).

Após o primeiro batimento cardíaco (início do período larval = Fase VI, segundo Juberthie 1964), a pigmentação dos tecidos é acentuada e têm lugar os processos preparatórios para a eclosão (Muñoz-Cuevas 1971), por movimentações corpóreas e com a ajuda do dente do ovo (quando presente) e das quelíceras, e, após a larva ter emergido do ovo, a subsequente ecdise para o primeiro ínstar ninfal.

A duração do período embrionário geralmente leva entre 30 e 60 dias (Immel 1955, Muñoz-Cuevas 1971, Willemart & Gnaspini 2004), porém é fortemente dependente de variação sazonal e temperatura (Faussek 1892, Juberthie 1964, Avram 1973, Muñoz-Cuevas 1971). Por exemplo, em *Paranemastoma sillii*, uma espécie de clima temperado, a taxa de eclosão dos ovos caiu de 95% por volta dos 18 °C para 0% a 20 - 21 °C (Avram 1973). A fase embrionária de *Odiellus gallicus*, outra espécie do hemisfério norte, durou 162 dias a 6 °C, 146 dias a 7 °C, e 84 dias a 11,5 °C, sendo as temperaturas letais mínima e máxima 0 °C e 20 °C, respectivamente, e nenhuma mortalidade foi observada entre 6 e 11,5 °C (Juberthie 1960). Em outro Eupnoi da

família Phalangidae com ampla distribuição, *Phalangium opilio*, o desenvolvimento dos embriões é fortemente retardado em temperaturas baixas, sendo inviável a 10 °C mesmo decorridos 250 dias, ao passo que apresenta duração de 129 dias a 15 °C, 40 dias a 20 °C, e 30 dias a 25 °C (Bachmann & Schaeffer 1983). Em *Pachylus quinamavidensis*, um membro da subordem Laniatores encontrado na zona subtropical andina (e estudado em laboratório, na França), o desenvolvimento levou 70 dias a 12 °C e 37 dias a 20 °C; com desenvolvimento anormal a baixo de 8 °C e acima de 25 °C; e não houve qualquer desenvolvimento a 5°C (Muñoz-Cuevas 1971).

Foi observada diapausa em ovos de inverno de diversas espécies, sendo por vezes parte essencial do desenvolvimento dos embriões. Faussek (1892) observou que os ovos de *Opilio parietinus* morrem se mantidos à temperatura ambiente: eles precisam passar pela baixa temperatura de um inverno e depois continuar seu desenvolvimento no solo. Os ovos de diversas espécies de clima temperado também passam por um período de hibernação, como as espécies *Leiobunum rotundum*, *Mitopus morio*, *Nemastoma lugubre*, *Oligolophus* spp., *Opilio parietinus* (que hiberna por 4-5 meses), e *Phalangium opilio* (Kästner 1935; Pfeiffer 1956; Phillipson 1959; Tischler 1967; Bachmann & Schaeffer 1983). Em contraposição, os Trogulidae reproduzem-se durante todo o ano, sendo que ovos postos antes do inverno hibernam, e os postos no verão não sofrem diapausa. Assim sendo, seu desenvolvimento embrionário pode durar entre 5 e 8 semanas para os ovos de verão (de junho a agosto) até 12 a 15 semanas para os ovos de inverno (Pabst 1953). Ficou constatado que os ovos postos no inverno, uma vez sob as condições apropriadas, se desenvolvem com a mesma velocidade que ovos mantidos no laboratório a 20 °C. Martens (1965) também observou diapausa em ovos de *Ischyropsalis* spp. postos no final do verão.

1.4 Objetivos

Considerando-se a lacuna existente na literatura sobre o desenvolvimento embrionário em opiliões neotropicais, e a variação de padrões reprodutivos observados em espécies da família Gonyleptidae, este projeto teve por principal objetivo a descrição do desenvolvimento embrionário de espécies de quatro subfamílias de Gonyleptidae, visando à ampliação do conhecimento sobre a formação dos embriões e larvas na subordem Laniatores, e à detecção de possíveis diferenças relacionadas a aspectos comportamentais e biológicos (como cuidado parental, ausência ou presença de muco envolvendo os ovos, número de ovos por postura, entre outros) no padrão de desenvolvimento embrionário das espécies, procurando estabelecer relações causais quando possível.

2 Materiais e Métodos

2.1 Espécies Estudadas

No presente estudo, foram enfocadas espécies pertencentes a quatro subfamílias da família Gonyleptidae: Caelopyginae (*Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922), figura 2.1 a), Progonyleptoidellinae (*Iporangaia pustulosa* (Mello-Leitão 1935), figura 2.1 b), Goniosomatinae (*Goniosoma proximum* (Mello-Leitão 1922) e *Goniosoma spelaeum* (Mello-Leitão 1923), figuras 2.1 c, d, respectivamente) e Mitobatinae (*Longiperna zonata* (Mello-Leitão 1935) e *Promitobates ornatus* (Mello-Leitão 1940), figuras 2.1 e, f, respectivamente). Estas subfamílias foram escolhidas tendo em vista a detecção de possíveis padrões distintos relacionados às formas de deposição dos ovos e/ou aos diferentes tipos de cuidado parental citados na literatura: em Goniosomatinae ocorre cuidado materno (Gnaspini 1995, Willemart & Gnaspini 2004), em Caelopyginae (Hara et al 2003) e Progonyleptoidellinae (Machado et al 2004) cuidado paterno (com abundância de muco cobrindo as desovas desta última e pouca quantidade de muco depositada nos Caelopyginae), e em Mitobatinae (Willemart 2001) há ausência de cuidado parental (a fêmea cobre os ovos com detritos e abandona o local). A descrição do desenvolvimento embrionário de duas espécies da mesma subfamília (Goniosomatinae) foi efetuada visando permitir a comparação entre as variações intra e interespecíficas; ou seja, para verificar se a variação que ocorre entre espécies do mesmo gênero é maior ou menor do que a que ocorre entre elas e espécies menos aparentadas e/ou que apresentam outro tipo de cuidado parental.

Alguns resultados foram obtidos no acompanhamento de ovos doados por colegas, para espécies de Caelopyginae (*Ampheres fuscopunctatus*, figura 2.2 a, coletores M. B da Silva e H. Y. Yamaguti), Goniosomatinae (*Goniosoma* sp. da Represa de Guaricana (Paraná), figura 2.2 b, obtenção no laboratório por M. Sobral) e Pachylinae (*Daguerreia inermes* e *Neosadocus* sp., respectivamente figura 2.2 c, com obtenção no laboratório por T. C. Santos, e figura 2.2 d, coletor H. Y. Yamaguti). Estes foram incluídos na esperança de traçar comparações úteis durante a discussão (capítulo 4), mas dada à amostragem restrita e a manutenção dos ovos em papel absorvente no laboratório (facilitando o ataque por fungos, como discutido no item 3.5), devem ser considerados com reservas.

2.2 Acompanhamento do Desenvolvimento Embrionário

Ovos foram fotografados com câmera digital NIKON D100, com resolução de 6.1 MPix, e lente macro com aumento máximo de 105x, a intervalos regulares de 1-2 dias, e por vezes usando anéis de extensão entre a lente e o corpo da máquina para permitir maior aproximação nas imagens. Dada à transparência do córion, esta metodologia se mostrou eficiente para acompanhar as mudanças externas na morfologia dos embriões, permitindo o acompanhamento dos mesmos desde o início da metamerização do prossoma até a emergência da larva. As fotografias de embriões apresentadas nas diversas figuras não sofreram quaisquer modificações, com exceção de recortes de ovos específicos e redimensionamento com fins de padronização das figuras.

2.3 Obtenção de Desovas

Duas estratégias foram adotadas com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento dos embriões das espécies selecionadas: o acompanhamento de desovas no campo sob condições naturais, e a manutenção de casais no laboratório para a obtenção de desovas em ambiente controlado.

2.4 Trabalho no campo

2.4.1 Área de Estudo

Para o acompanhamento do desenvolvimento embrionário no campo, bem como para a coleta de material trazido ao laboratório, foi escolhido o Parque Estadual Intervales (PEI), uma reserva de Mata Atlântica no sul do Estado de São Paulo (ver também Gnaspini 1996) em excelente estado de conservação, situada entre as coordenadas 24°12' e 24°32' S, e 48°03' e 48°32' W. Essa reserva foi escolhida por diversos fatores, a saber: presença de todas as espécies selecionadas e com abundância de indivíduos, elevado grau de conservação da reserva, grande número de pesquisas recentes com opiliões na região, fácil acesso às áreas de coleta e excelente infraestrutura para pesquisa em geral.

Espécimes de *I. pustulosa* e *G. proximum* foram acompanhados (e casais e ovos coletados) nos arredores da Cachoeira do Mirante e na Trilha do Caçadinha; desovas de *A. leucopheus* foram acompanhadas (e casais e ovos coletados) na Trilha do Lago Negro e na Trilha Nova, e o acompanhamento do desenvolvimento embrionário (e coleta de casais e ovos) em *G. spelaeum* foi efetuado principalmente no sumidouro (conhecido como “Beija-Flor”) da Gruta Colorida, embora tenham sido acompanhadas 3 desovas da espécie nas Grutas do Cipó, do Fóssil Desconhecido e do Tatu. Casais de ambas as espécies de Mitobatinae foram coletados próximo à Cachoeira da Água

Comprida e nas cercanias da Cachoeira do Mirante, e o reconhecimento de alguns locais de deposição de *L. zonata* na Cachoeira do Mirante permitiu também a coleta de ovos desta espécie no campo. A tabela 2.I mostra a variação da temperatura na Estação Meteorológica de Intervalos nos referidos períodos de acompanhamento dos embriões. Todas as áreas de acompanhamento localizam-se em um raio de 3 km da EM; variações de temperatura referem-se aos menores e maiores valores observados para as temperaturas mínimas e máximas nos três horários de coleta de dados na estação (8:00, 14:00 e 20:00 horas) em todos os dias de cada mês; médias e desvios padrão foram calculados a partir de todos os valores de temperatura observados (em todos os dias de cada mês e nos três horários de coleta).

2.4.2 Viagens de Observação e Coleta

Para a observação no campo do desenvolvimento embrionário, optou-se pelos meses quentes e úmidos do verão, que correspondem ao pico reprodutivo das espécies em questão, e conseguinte o período de maior abundância de ovos. O acompanhamento foi realizado por três anos consecutivos (2006 – 2008), tendo sido efetuadas, durante os meses de janeiro a abril, sete viagens em 2006, 6 viagens em 2007 e 7 viagens em 2008, todas com duração aproximada de 15 a 20 dias.

No verão de 2006 foram acompanhadas desovas de *I. pustulosa* e *G. proximum*, e o verão de 2007 correspondeu ao acompanhamento das desovas de *A. leucopheus* e *G. spelaum*. O verão de 2008 incluiu a coleta de ovos fixados das espécies previamente acompanhadas e a coleta e acompanhamento (em laboratório localizado na própria reserva) dos ovos de *L. zonata*.

Foram efetuadas 6 viagens adicionais para a coleta dos casais para serem trazidos ao laboratório, incluindo uma viagem inicial em agosto de 2005 e outras em intervalos irregulares, quando da carência de material biológico no laboratório. Parte do material, entretanto, foi trazida ao término dos períodos anuais de observação.

2.4.3 Acompanhamento dos Embriões no Campo

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário no campo se deu no próprio local de deposição dos ovos e com um mínimo de interferência (machos e fêmeas guardando desovas inevitavelmente eram assustados pelos disparos dos *flashes*), e foi possível para as espécies de Caelopyginae, Goniosomatinae e Progonyleptoidellinae. Em *L. zonata*, embora desovas tenham sido obtidas no campo, foi necessário remover os ovos das folhas e submetê-los à limpeza do córion para permitir a visualização dos embriões, tendo em vista a localização dos ovos e a presença de detritos aderidos ao córion.

Assim, amostras com mais de 200 ovos de *A. leucopheus* (em 9 desovas compostas), de *I. pustulosa* (em 4 desovas compostas), de *G. proximum* (em 10 desovas simples) e de *G. spelaeum* (em 9 desovas simples) foram acompanhadas diariamente no campo, tendo sido selecionados 20 ovos de cada espécie para análise de durações e para a descrição das modificações morfológicas durante o desenvolvimento embrionário. Também foram coletados 54 ovos idênticos no local de deposição observado para *L. zonata*, tendo sido estes, como mencionado, removidos das folhas em que foram depositos e mantidos em papel absorvente úmido durante o desenvolvimento dos embriões.

Ovos das espécies de Caelopyginae, Goniosomatinae e Progonyleptoidellinae também foram coletados e fixados no campo em intervalos de 1 – 3 dias, visando às metodologias complementares aplicadas no laboratório.

2.5 Trabalho no laboratório

2.5.1 Obtenção de desovas no laboratório

Para a obtenção de desovas no laboratório foram trazidos diversos casais de *A. leucopheus* (7 machos e 3 fêmeas), *I. pustulosa* (3 machos e 4 fêmeas), *G. proximum* (3 machos e 9 fêmeas), *G. spelaeum* (8 machos e 12 fêmeas, sendo 3 ovígeras), *L. zonata* (7 machos e 12 fêmeas) e *P. ornatus* (6 machos e 8 fêmeas) ao longo dos 4 anos do estudo. Não foram obtidas no laboratório, entretanto, desovas das espécies de Caelopyginae, Goniosomatinae ou Progonyleptoidellinae, e apenas 2 ovos de *P. ornatus* e 1 ovo de *L. zonata* foram depositados nos terrários, de modo que a amostra nos Mitobatinae ficou bastante reduzida, mesmo incluídos os ovos obtidos no campo ($n = 2$ em *P. ornatus*, $n = 6$ em *L. zonata*).

Também as desovas recebidas por colegas foram acompanhadas parcialmente, sendo referentes ao goniosomatíneo de Guaricana (Goniosomatinae; $n = 4$), *Daguerreia inermes* (Pachylinae; $n = 4$), *Neosadocus* sp. (Gonyleptinae; $n = 2$) e *Ampheres fuscopunctatus* (Caelopyginae; $n = 1$).

2.5.2 Análises Histológicas e Microscopia Eletrônica de Varredura

Ovos com embriões em diversos estágios de desenvolvimento de *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum* e *G. spelaeum* foram coletados e fixados em etanol a 70%, tendo sido trazidos ao laboratório para análises histológicas e de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Ovos de outras espécies não foram incluídos dada a sua escassez, tendo em vista a utilização do material obtido para o acompanhamento do desenvolvimento ao longo do tempo. Os ovos trazidos ao laboratório foram então submetidos inteiros (sem a remoção do córion) a uma seqüência de desidratação por

etanol a 70 – 80 – 90%, com submersão por 15 minutos em cada, e três sessões de 10 minutos em etanol a 100%.

Ovos destinados à análise histológica foram imersos, após sua desidratação, em 3 banhos de 10 minutos em Xylol, incluídos em blocos de parafina quente e, após o endurecimento, levados ao micrótomo. Cortes foram então devolvidos à estufa por 30 minutos, mergulhados 20 vezes em Xylol, banhados duas vezes por dois minutos em etanol a 100% e hidratadas em uma série de banhos de dois minutos em etanol a 90 – 80 – 70% e cinco sessões de dois minutos em água destilada. O material foi então corado, começando pela imersão em hematoxilina por 15 minutos, lavagem em água corrente por 10 minutos e um banho de 2 minutos em eosina. Após a aplicação dos corantes, o material foi novamente desidratado em série de etanol a 70 – 80 – 90% e duas sessões de etanol a 100% por dois minutos cada, sendo em seguida substituído em dois banhos de 2 minutos em Xylol e montado em lâminas, posteriormente analisadas e fotografadas em um microscópio ótico Leica.

Para as análises com microscopia eletrônica de varredura, não foi efetuada limpeza prévia do material, uma vez que os embriões foram desidratados ainda com o córion. Ovos desidratados foram diretamente submetidos à substituição por gás carbônico em um “Critical Point Dryer BAL-TEC CPD 030”, montados em “*stubs*” e folheados a ouro em um “Sputter Coater Balzer SCD 50”. Os materiais foram então analisados no microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 940 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB-USP.

2.6 Descrição da morfologia embrionária

Foi adotada, para a caracterização do desenvolvimento embrionário, a subdivisão proposta por Moritz (1957, 1959), Juberthie (1960, 1964, 1965) e Muñoz-Cuevas (1971), passando o embrião pelas seguintes etapas até atingir a fase larval e estar pronto para emergir do ovo: clivagem, formação da banda germinativa, metamerização do prossoma, inversão e organogênese larval. Tendo em vista diferenças no decorrer do desenvolvimento embrionário das espécies aqui citadas e aquelas discutidas na literatura, contudo, foram selecionados eventos para marcar o início de cada fase, permitindo uma comparação melhor entre as espécies. Assim, foi considerado que a metamerização do prossoma tem início com o aparecimento de cristas transversais paralelas na superfície do embrião, a inversão começa com o aparecimento dos primórdios apendiculares, a organogênese larval se inicia no princípio da formação do ceco digestivo e a fase larval começa quando completado o padrão de pigmentação dos embriões.

2.7 Estrutura das Desovas e Sobrevivência dos Ovos

Análises sobre a variação no número de ovos durante o desenvolvimento foram efetuadas somente para as espécies com cuidado materno, já nas espécies com cuidado paterno a adição de desovas dá origem a desovas compostas, originadas por fêmeas diferentes, aumentando muito o número de ovos em cada folha e atrapalhando o acompanhamento do número de ovos retirados das desovas individualmente.

Assim, foi contado o número de ovos em 5 desovas de cada espécie de Goniosomatinae, sendo calculada a adição percentual de ovos entre o primeiro evento de deposição e o número máximo de ovos observados em cada desova (AP), através da fórmula

$$AP = \frac{\text{Média de ovos depositados (DC)} - \text{Média de ovos na primeira deposição (AD)}}{\text{Média de ovos depositados (DC)}} \times 100\%,$$

bem como a redução relativa na quantidade de ovos até o final do desenvolvimento embrionário, as taxas de redução de ovos (TR), segundo a fórmula

$$TR = \frac{\text{Média de ovos depositados (DC)} - \text{Média de ovos antes da primeira eclosão (PE)}}{\text{Média de ovos depositados (DC)}} \times 100\%.$$

2.8 Volume dos Ovos e Aumento Relativo

Foram auferidos ainda, em milímetros com um paquímetro digital e precisão de duas casas decimais (10 µm) os diâmetros de 10 ovos recentemente depositados e 10 ovos na fase larval (L) de *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum* e *G. spelaeum*. A partir destes valores, foi calculado o incremento percentual no volume dos ovos (Δvol%), através da fórmula

$$\Delta vol\% = \frac{\pi \times (\Phi_f/2)^2 - \pi \times (\Phi_i/2)^2}{\pi \times (\Phi_f/2)^2} \times 100\%$$

onde:
 Φ_i é a média dos diâmetros de ovos iniciais
 Φ_f é a média dos diâmetros de ovos finais.

Também foram medidos os diâmetros de 10 óvulos obtidos na dissecação de uma fêmea ovígera de *G. spelaeum* fixada em etanol a 70% (e contendo 94 óvulos), sendo igualmente 10 óvulos comparados aos ovos através da fórmula acima.

Tabela 2.I. Variação da temperatura (em °C) na Estação Meteorológica de Intervalos nos meses de janeiro a abril de 2006, 2007 e 2008. Fonte: Instituto Florestal.

Ano	Mês	Variação de Temperatura (°C)		Médias $\pm$ d. p. (°C)	
		Mínimas	Máximas	Mínimas	Máximas
2006	Fevereiro	13 - 21	18 - 29	18,3 $\pm$ 2,2	21,9 $\pm$ 3,8
	Março	15 - 22	17 - 33	18,4 $\pm$ 1,8	22,0 $\pm$ 3,9
	Abril	8 - 19	10 - 27	15,1 $\pm$ 2,4	18,9 $\pm$ 4,2
	Maio	1 - 17	8 - 26	11,0 $\pm$ 2,9	14,7 $\pm$ 4,7
2007	Janeiro	13 - 26	13 - 31	18,7 $\pm$ 2,3	22,4 $\pm$ 4,1
	Fevereiro	15 - 24	16 - 31	18,3 $\pm$ 2,3	22,8 $\pm$ 5,3
	Março	11 - 24	12 - 32	17,4 $\pm$ 2,2	20,5 $\pm$ 3,7
	Abril	11 - 21	14 - 29	12,2 $\pm$ 3,8	16,1 $\pm$ 5,2

Figura 2.1. Espécies selecionadas para o estudo. (a,b) Machos de *A. leucopheus* (a) e *I. pustulosa* (b) guardando desovas; (b,c) fêmeas de *G. proximum* (c) e *G. spelaeum* (d) guardando desovas; (e) Macho de *L. zonata*; (f) fêmea de *P. ornatus*.

Figura 2.2. Indivíduos de (a) *A. fuscopunctatus* (extraído de Pinto-da-Rocha, 2002), (b) do goniosomatíneo de Guaricana, de (c) *D. inermis* e (d) *Neosadocus* sp..

3 Resultados

Neste capítulo, são apresentados os resultados referentes às espécies estudadas no campo e dados complementares obtidos no laboratório. Como os dados referentes a Progonyleptoidellinae, Caelopyginae e Goniosomatinae já se encontram formatados como manuscritos submetidos para publicação, os dados completos são apresentados como apêndices, e um resumo dos principais resultados é apresentado no corpo deste texto. Desse modo, as figuras referentes aos itens 3.3 e 3.4 encontram-se nos anexos I e II, respectivamente.

3.1 Estrutura das Desovas e Sobrevivência dos Ovos

Embora nas espécies com cuidado materno (capítulo 3.3) cada desova seja produto de apenas uma fêmea, não apresentando o mosaico de desovas encontradas nas espécies com cuidado paterno (capítulo 3.2), a oviposição não ocorre necessariamente como um evento único e completo, havendo a inserção de ovos tardios (tabela 3.I). Em *G. proximum* (n = 5 desovas) estes correspondem a cerca de 4,0% do total de ovos depositados, completando-se a oviposição em um prazo de 5 a 10 dias após os primeiros ovos. Em *G. spelaeum* (n = 5 desovas) ovos tardios representam aproximadamente 1,4% de todos os ovos, com as últimas adições entre 4 e 7 dias após a deposição dos primeiros ovos. Com isso, embora em *G. spelaeum* as desovas apresentem relativa homogeneidade no estágio de desenvolvimento dos ovos (figura 3.1 a), em *G. proximum* ocorrem ovos com embriões em estágios bastante distintos (figura 3.1 b). Ainda com relação ao máximo de ovos depositados (DC), a tabela 3.I mostra que ocorre redução no número de ovos até o momento das primeiras eclosões (PE). Desovas de *G. spelaeum* apresentaram menor taxa de redução de ovos (TR = 2,8%) que a observada para desovas de *G. proximum* (TR = 9,2%).

Foi observada no campo a contaminação de ovos por fungos em *I. pustulosa* (figura 3.2 a, b), *A. leucopheus* (figura 3.2 c) e *G. proximum* (figura 3.2 d). Em *G. spelaeum*, embora não tenha sido detectada contaminação por fungos, foi presenciado um ataque a uma desova por uma ninfa do 4º instar de *Zelurus travassosi* (Reduviidae Heteroptera), freqüente predador dos adultos nas cavernas (e.g., Gnaspini 1996). A fêmea que guardava a desova abandonou o local quando da aproximação do predador, que passou a se alimentar dos ovos (figura 3.3 a, b), resultando na completa perda da desova.

3.2 Aumento Volumétrico dos Ovos

A tabela 3.II mostra as médias e desvios padrão obtidas para o diâmetro em ovos logo após sua deposição (AD) e na fase larval (L) em *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G.*

proximum e *G. spelaeum*, bem como para os óvulos nesta última. A tabela 3.II ainda inclui o aumento volumétrico percentual observado nestas espécies em relação aos ovos recentemente depositados, tendo sido observado o menor aumento proporcional em *A. leucopheus*, crescendo progressivamente em *I. pustulosa* e *G. proximum*, e apresentando valor máximo em *G. spelaeum*.

3.3 Desenvolvimento Embrionário em Caelopyginae e Progonyleptoidellinae

Os dados completos estão apresentados no Apêndice I, e aqui está apresentado um resumo das principais mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário dessas espécies. Durante a clivagem (fase I) e a formação da banda germinativa (fase II) nas espécies estudadas destas subfamílias, não é perceptível qualquer diferenciação externa do ovo ou do embrião ou tampouco o surgimento visível de uma massa de células germinativas, e o ovo está totalmente branco e com formato aproximadamente esférico (Anexo I, figuras 4, 5).

A primeira diferenciação observável externamente sofrida pelo embrião ocorre no início da metamerização do prossoma (fase III), e corresponde ao surgimento de 6 pares de estrias paralelas ao redor do embrião, perpendiculares ao eixo antero-posterior do mesmo (Anexo I, figuras 6, 18).

A inversão do embrião (fase IV) se inicia quando se formam, sob a forma de 2 fileiras com 6 protuberâncias de extremidades globosas na região ventral do embrião, os primórdios apendiculares (Anexo I, figuras 7, 19). Estes passam por contínuo alongamento, crescendo até aproximadamente $0,7 \pm 0,2$ mm (observação visual em relação ao tamanho do ovo) e ainda se mantendo eretos e curvados para dentro (Anexo I, figuras 8, 20). Embora não seja sempre nítido, pode ser notado que os primórdios apendiculares já se apresentam segmentados, com os futuros artículos já definidos (Anexo I, figuras 9, 21). Evidencia-se então uma redução no volume corporal do embrião, e o corpo adquire formato oval e achatado ventralmente, enquanto as pernas continuam a crescer acompanhando a curvatura do córion (Anexo I, figuras 10, 22). Um sulco longitudinal começa a ficar evidente no corpo do embrião, dividindo-o em dois “lobos” ou “hemisférios” laterais, o tubo cardíaco. Entrementes, os primórdios apendiculares assumem disposição característica, com as quelíceras em posição anterior e lateral, os pedipalpos e pernas I e II estendendo-se lateralmente até a região ventral do ovo e os quatro primórdios posteriores (futuros pares de pernas III e IV) circundando a região posterior do corpo do embrião e com extremidades posteriores cobrindo ventralmente as extremidades dos pares de pernas I e II (Anexo I, figuras 11, 23).

A organogênese larval (fase V) tem início com o aparecimento de fendas transversais (entre 2 e 4) dividindo cada hemisfério, no início da formação do ceco digestivo (Anexo I, figuras 13, 25). Com o progressivo alongamento e achatamento do corpo, as extremidades do corpo do embrião se diferenciam, sendo que na região posterior cada “lobo” fica arredondado e próximo ao outro, enquanto que na região cefálica os lobos se alargam e se separam, delimitando entre si uma região na qual começam a surgir os olhos (Anexo I, figuras 13-14, 25-26).

O processo de pigmentação difere ligeiramente entre as espécies: em *A. leucopheus* a pigmentação tem início na base dos apêndices e aparece de forma atenuada na região da placa cefálica (Anexo I, figura 15), enquanto que em *I. pustulosa* inicia-se pela borda da placa cefálica sob a forma de um “aro” levemente escurecido sobre e ao lado dos olhos, delimitando uma região mais esbranquiçada entre os olhos e tais molduras (Anexo I, figura 27). Em seguida, em *A. leucopheus*, a coloração alaranjada da base dos apêndices se propaga no sentido das extremidades, sem aumentar em intensidade, e começa então a ser identificável a estrutura do “aro ocular” pigmentar (Anexo I, figuras 16-17). Em *I. pustulosa* as bordas das pernas dos embriões passam a assumir coloração mais escura, inicialmente na base dos apêndices e progredindo sucessivamente em direção às suas extremidades (Anexo I, figuras 28-29).

Ao final do desenvolvimento dos embriões, de acordo com a literatura após o primeiro batimento cardíaco, a larva (fase L) está plenamente formada e já com o padrão pigmentar com o qual emergirá do ovo, com pigmentação “rajada” nos apêndices e difusa na borda da placa cefálica em *A. leucopheus* e marrom-escura bastante acentuada da borda dos apêndices e da placa cefálica em *I. pustulosa* (Anexo I, figuras 30-33).

3.4 Desenvolvimento Embrionário em Goniosomatinae

Os dados completos estão apresentados no Apêndice II, e aqui está apresentado um resumo das principais mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário dessas espécies. Por serem depositados com coloração marrom clara ou bege, ovos de *G. spelaeum* e *G. proximum* permitem o reconhecimento da clivagem, uma vez estabelecida a blastoderme celular (Anexo II, figuras 3-4, 6-7). Esta estrutura foi identificada somente em 2 ocasiões em *G. proximum* e em 3 momentos em *G. spelaeum*, sendo portanto esta a amostragem referente à separação entre a clivagem (I) e a formação da banda germinativa (II) exposta na tabela 3.III. Tendo em vista não ter sido observada a condensação celular em uma massa polar, este momento foi considerado, para estas espécies, como a

etapa final da fase de clivagem (I), tendo em seguida início a formação da banda germinativa (fase II) do embrião.

A exemplo do observado nas outras espécies, a metamerização do prossoma (fase III) tem início com o aparecimento de 6 cristas transversais, com coloração amarelada, na região ventral do embrião (Anexo II, figuras 5, 8).

Estas cristas se condensam progressivamente, formando ao início da inversão (fase IV) 6 pares de bulbos ventrais com coloração amarela mais clara, os primórdios apendiculares (Anexo II, figuras 9, 21). Concomitante à formação dos primórdios apendiculares, a região ventral, especificamente na porção localizada entre os bulbos evidentes, é organizada em um epitélio de coloração mais clara, que se expande progressivamente no eixo antero-posterior, especialmente na região anterior (Anexo II, figuras 10, 22). Os apêndices continuam a se desenvolver, assumindo coloração esbranquiçada e acompanhando a curvatura interna do córion, enquanto o corpo diminui em volume e sofre achatamento dorso-ventral, e o epitélio ventral é expandido na região anterior, sendo estendido dorsalmente e formando dois lobos na massa celular anterior, de modo a definir o sítio de organização cefálica (Anexo II, figuras 10-11, 22-24). Mais adiante começa a aparecer o tubo cardíaco, marcado por uma tênue linha dividindo o corpo longitudinalmente em dois “lobos”, ficando gradativamente mais evidente (Anexo II, figuras 12, 25). Na região posterior, o corpo assume forma arredondada, e a massa celular dorsal termina na borda posterior do epitélio ventral. Nestas espécies, as pernas não atingem pleno desenvolvimento durante a inversão, continuando a crescer durante vários dias na organogênese larval (fase V).

A fase V (organogênese larval) inicia-se com o aparecimento dos cecos digestivos, marcado pelo aparecimento de 2 a 4 fissuras transversais em cada lobo lateral (Anexo II, figuras 14, 26). A organização cefálica progride, com os olhos aparecendo entre as projeções epiteliais anteriores na região que dará origem ao câmor ocular (Anexo II, figuras 16, 27). Enquanto aumenta o grau de organização dos olhos e da região cefálica, na parte posterior os cecos digestivos continuam a se desenvolver, e se destacam protuberâncias na região dorsal do opistossoma. Nesta etapa os apêndices atingem pleno desenvolvimento nestas espécies, assumindo a disposição característica descrita no item 3.3 (Anexo II, figuras 19, 31-32). O processo de pigmentação novamente difere entre as espécies, sendo igualmente descrito para cada uma individualmente.

Pigmentos aparecem inicialmente em *G. proximum* de forma difusa na porção dorsal de cada “lobo” lateral, sob forma de um escurecimento nas bordas (em especial as anteriores), seguido de coloração mais escura nos apêndices por toda sua extensão (Anexo II, figura 17). Concomitante as projeções frontais dos “lobos” laterais circundam

os olhos delimitando o *ocularium*, e os olhos ficam alongados longitudinalmente e mais largos próximos à base das quelíceras (Anexo II, figura 18). Em seguida acentua-se a pigmentação dos apêndices, definindo um padrão rajado nas quelíceras (que apresentam bases mais escuras em seus artículos), e aumenta a organização cefálica, com as bordas laterais da placa assumindo coloração marrom escura, um tom mais claro de marrom em porções mais internas e o *ocularium* com um tom bege ou amarelado. A seguir a articulação entre fêmures e tíbias das pernas assumem coloração marrom escura, e a região cefálica organiza-se em 4 placas, duas horizontais situadas abaixo dos olhos e duas verticais, laterais aos mesmos. Entrementes os artículos das quelíceras apresentam um gradiente de cores, com suas bases marrons e extremidades alaranjadas, e se aproximam da linha médio-anterior (Anexo II, figura 19). Os fêmures das pernas passam a apresentar faixas escuras transversais paralelas, tendo as tíbias coloração bege homogênea e os tarsos marrom clara (Anexo II, figura 20). Os olhos neste ponto assumem organização em duas porções, uma basal com cerca de 2/3 do volume e uma projeção de células destacando-se em posição mais dorsal, e são afastados da linha médio-anterior.

Em *G. spelaeum*, a pigmentação se inicia com as quelíceras e pedipalpos assumindo coloração acinzentada, e os fêmures das pernas adquirindo a coloração bege alaranjada da região dorsal (Anexo II, figura 28). Na região anterior, o par de placas horizontais sob os olhos aparecem como duas linhas finas estendendo-se lateralmente da base dos olhos, e em associação com as largas placas verticais em cada lado dos olhos delimitam o *ocularium* (Anexo II, figura 29). Em seguida as margens das placas laterais passam a apresentar um tom marrom claro, e as articulações das pernas assumem coloração laranja escura, e o tom alaranjado progride distalmente, com um padrão intercalado de tonalidade clara / escura aparecendo inicialmente nas margens dos fêmures e ficando evidente (Anexo II, figura 30). A organização cefálica continua, com as placas circundando o *ocularium* e os olhos assumindo estrutura dupla de modo similar ao descrito em *G. proximum* (Anexo II, figura 31). Em um próximo momento os fêmures estão fortemente marcados por faixas transversais, e as tíbias e tarsos apresentam um padrão de pigmentação nitidamente rajado (Anexo II, figura 32). Na região anterior, as placas laterais apresentam coloração cinza clara, enquanto a porção dorsal da placa cefálica assume coloração marrom clara, permanecendo até este momento a coloração bege no opistossoma.

Após completado o padrão de pigmentação, tem início a fase larval (L), e em ambas as espécies o embrião apresenta cor marrom-escura e somente o *ocularium* e as regiões laterais das quelíceras apresentando tonalidade esbranquiçada, e algumas regiões alaranjadas aparecendo entre as pernas (Anexo II, figuras 33, 35-36).

No goniosomatíneo de Guaricana, foi possível acompanhar todo o desenvolvimento dos embriões, embora não haja diferenciação externa visível entre a clivagem (fase I) e a formação da banda germinativa (fase II), permanecendo os ovos com coloração parda homogênea (figura 3.4 a). Na metamerização do prossoma surgem as estrias transversais pareadas, com coloração clara (figura 3.4 b). Durante a inversão do embrião os primórdios apendiculares desenvolvem-se gradativamente como nas demais espécies (figura 3.4 c), e ao final desta, a exemplo do observado em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, e em contraposição ao notado nos demais Goniosomatinae, as pernas já atingiram pleno desenvolvimento e assumiram a mencionada disposição característica (figura 3.4 d). A organogênese larval inicia-se de maneira similar à dos demais Goniosomatinae, com a formação do ceco digestivo e o aparecimento dos olhos (figura 3.4 e, f). O padrão de pigmentação não foi observado com tanto detalhe como nas demais espécies, dada a pequena amostra de ovos acompanhados, mas em estágio avançado mostra coloração marrom escura na placa cefálica e quelíceras, bem como nos tarsos dos outros apêndices, com as demais partes do corpo apresentando coloração mais clara (figura 3.4 g). O padrão completo de pigmentação atingido na fase larval (L) assemelha-se muito ao observado nas outras espécies da subfamília (figura 3.4 h).

3.5 Desenvolvimento Embrionário em Mitobatinae

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário em *Longiperna zonata* e *Promitobates ornatus* esbarrou em uma série de complicações, tendo sido obtidos somente resultados parciais. Como as fêmeas das espécies de Mitobatinae depositam os ovos em substrato variado, cobrem-nos com detritos e os abandonam sem que haja guarda da desova, o reconhecimento das espécies no campo carece de um testemunho do evento de oviposição. Depois de identificado um sítio de oviposição para *L. zonata* (Buzzato, B. e Requena, G., *com. pess.*), em folhas à margem do rio e cobertos de sedimentos (figura 3.5 a), posteriormente, foram acompanhados 2 eventos de oviposição desta espécie, e cerca de 54 ovos idênticos foram obtidos no campo. Dada a adesão destes ovos ao substrato e sua cobertura por detritos, entretanto, foi necessária sua remoção das folhas e manutenção em papel absorvente (“mata-borrão”), para que fosse possível o acompanhamento do desenvolvimento embrionário (figura 3.5 b). A criação de casais no laboratório para a obtenção de ovos não gerou amostras consideráveis de nenhuma das duas espécies, tendo sido obtidos no decorrer de todo o estudo somente 4 ovos de *L. zonata* e 13 ovos de *P. ornatus* em cativeiro.

A manipulação dos ovos em sua retirada do substrato e na remoção dos muitos detritos aderidos, necessária para a observação das modificações nos embriões no decorrer do tempo, mostrou-se bastante danosa. Em sua maior parte, ovos “limpos” foram rapidamente inviabilizados pelo acúmulo de fungos circundando o córion, e em 5 dos ovos coletados no campo (*L. zonata*) e 4 obtidos no laboratório (1 de *L. zonata* e 3 de *P. ornatus*) houve rompimento acidental do córion durante a limpeza, com imediata morte dos embriões. Assim, apenas em ovos que foram deixados mais “sujos”, ou seja, com diversos sedimentos ainda aderidos ao córion, foi completado o desenvolvimento embrionário destas espécies, de modo que somente 18 embriões (dentre os 54 ovos) de *L. zonata* coletados no campo completaram seu desenvolvimento, e somente 1 ovo desta espécie e 2 ovos de *P. ornatus* obtidos no laboratório chegaram a eclodir.

Outro problema enfrentado com as espécies desta subfamília reside em uma menor transparência do córion das espécies aqui abordadas em relação às outras espécies estudadas (figura 3.6 a, d). Esta menor transparência, associada aos problemas relativos à remoção dos detritos, impediu o reconhecimento das fases iniciais do desenvolvimento embrionário, sendo possível somente reconhecer modificações no embrião após o início da pigmentação do mesmo (figura 3.6 b, e). Ademais, ao atingir a pigmentação plena na fase larval, esta menor transparência dificultou o reconhecimento das estruturas e processos envolvidos, e os ovos finais destas espécies apresentam uma coloração escura uniforme (figura 3.6 c, f). A pequena amostragem nestas espécies não permitiu a utilização de ovos para o tratamento histológico e/ou para microscopia eletrônica, além de aumentar muito a incerteza das observações efetuadas pelo acompanhamento fotográfico. Ademais, os detritos remanescentes no córion dos ovos que se mantiveram viáveis, associados à referida menor transparência do mesmo e à reduzida amostragem fotográfica impossibilitaram, para estas espécies, uma descrição dos eventos transcorridos no período embrionário.

3.6 Observações Complementares

Nas desovas de *A. fuscopunctatus* (figura 3.7 a, b, c) e *Neosadocus* sp. (figura 3.7 d, e, f), somente foram possíveis inferências sobre a organogênese (V) e a fase larval (L), como mostra a tabela 3.III. Na espécie de Caelopyginae, embora se tratasse de uma desova múltipla com ovos em diferentes fases, isto se deveu ao fato de somente os ovos com embriões em avançado grau de desenvolvimento atingirem a eclosão, tendo os ovos trazidos na fase I / II (figura 3.7 a) sido completamente atacados por fungos em questão de 1 semana, mesmo sem terem sido removidos da folha em que foram depositados. Assim, somente alguns ovos com embriões já no início do

processo de pigmentação (figura 3.7 b) atingiram a fase larval (figura 3.7 c) e completaram seu desenvolvimento. Já na espécie observada do gênero *Neosadocus*, com ovos correspondendo à desova de uma só fêmea, embriões foram trazidos já no início da organogênese larval (V), podendo assim somente ser acompanhados a partir desta fase (figura 3.7 d). O início do processo de pigmentação parece similar ao observado em *I. pustulosa*, com coloração alaranjada a partir da base dos apêndices e marrom escura na placa cefálica (figura 3.7 e). Também o padrão completo de pigmentação na fase larval mostrou certa similaridade com a espécie de Progonyleptoidellinae, com coloração marrom escura difusa por todo o corpo do embrião (figura 3.7 f).

A exemplo do ocorrido com as espécies de Mitobatinae, em *D. inermes* não foi possível se diferenciar as fases I a IV, já que mesmo em embriões aparentemente em fase de inversão (IV) a espessura e/ou menor transparência do córion não permitem uma observação clara dos eventos (figura 3.8 a). Por outro lado, o início da formação do ceco digestivo e o aparecimento dos olhos puderam ser observados, e nesta espécie são rapidamente seguidos de leve pigmentação das pernas (figura 3.8 b). A pigmentação torna-se mais acentuada no decorrer da organogênese larval (V), sem no entanto ocorrer pigmentação na região cefálica (figura 3.8 c). O padrão de pigmentação completo, atingido na fase larval (L), difere muito do observado nas demais espécies, com alguma pigmentação na placa cefálica delimitando o *ocularium* e coloração marrom escura acentuada nos apêndices (figura 3.8 d).

3.7 Análise Comparada da Temporização do Desenvolvimento Embrionário

A tabela 3.III apresenta a duração observada para cada fase do desenvolvimento embrionário em todas as espécies estudadas (fases I – V, L), as somas dos valores mínimos e máximos para cada fase (DET1) e a duração total observada para o desenvolvimento embrionário (DET2). As durações correspondem às fases passíveis de identificação em cada espécie, e foram organizadas por esse critério em detrimento de ordem alfabética e/ou filogenética. Em *D. inermes*, além da pequena amostra acompanhada (em 4 ovos os embriões completaram seu desenvolvimento, e apenas 1 ovo foi acompanhado em sua totalidade), a data de deposição dos ovos não é certa (há incerteza de cerca de 7 dias), tornando alguns dos valores sujeitos a possíveis alterações, especialmente nos dados referentes às etapas iniciais (fases I a IV) e à duração total do período embrionário nessa espécie. Assim, o período embrionário deve ter duração de 19 a 38 dias (ou 26 a 45 dias), sendo necessários entre 9 e 17 dias (ou 16 e 24 dias) para as primeiras quatro fases do desenvolvimento do embrião (I – IV).

Na tabela 3.IV estão expostos os valores percentuais de cada etapa em relação à duração total do desenvolvimento embrionário (DET1), para as espécies em que esse valor pôde ser determinado. Nesse caso, para fins de comparação entre todas as espécies com diferentes fases visíveis, foram apresentados também os valores percentuais de fases em conjunto. Assim, estão incluídas as somas das fases I, II, III e IV para todas as espécies, bem como das fases I e II para *G. proximum* e *G. spelaeum*. Visando facilitar a análise comparativa destes resultados foram esboçados gráficos dos valores mínimos (a) e máximos (b) de duração de cada fase em relação à duração total do período embrionário, para as espécies nas quais somente as fases I e II foram agrupadas (figura 3.9 a, b) e com as fases I a IV somadas em todas as espécies (figura 3.10 a, b).

Tabela 3.I. Número de ovos em 5 desovas de *G. proximum* e *G. spelaeum* desde sua postura até 2 – 3 dias antes da emergência das larvas. Na tabela: AD (após deposição) – 1 a 2 dias após o início da deposição; DC (deposição completa) – 5 a 10 dias após o início da deposição dos ovos em *G. proximum*, 5 a 7 dias após em *G. spelaeum*; PE (próximo à eclosão) – 1 a 2 dias antes das primeiras larvas emergirem; TR - Taxa de redução de ovos, calculada por $[(\text{Med DC} - \text{Med PE})/\text{Med DC}] \times 100\%$.

Amostra	<i>G. proximum</i>			<i>G. spelaeum</i>		
	AD	DC	PE	1 - 2 dias	5 - 7 dias	PE
1	184	188	169	158	161	161
2	177	183	172	83	84	84
3	121	123	109	107	107	103
4	161	161	155	111	113	113
5	128	148	124	104	106	94
Med ± d.p.	154,2 ± 28,47	160,6 ± 26,58	145,8 ± 28,01	112,6 ± 27,59	114,2 ± 28,38	111,0 ± 29,94
TP	9,2 %			2,8%		

Tabela 3.II. Médias e desvios padrão (mm) dos diâmetros de ovos iniciais (n=10) e finais (n=10) em *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum* e *G. spelaeum*, bem como de óvulos retirados de uma fêmea ovígera de *G. spelaeum* (n=10). Na tabela: Ov – óvulos extraídos de fêmea ovígera; AD (após deposição) – ovos em 1 a 2 dias após o início da deposição; L – ovos na fase larval; $\Delta\text{vol}\%$ - variação percentual no volume dos ovos, calculada por $\Delta\text{vol}\% = \{[(\text{volume médio final} - \text{volume médio inicial})/(\text{volume médio final})] \times 100\%$; volumes médios estimados por $\pi \times r_{\text{méd}}^2$.

Espécie	Ov	AD	L	$\Delta\text{vol} \%$
<i>A. leucopheus</i>	-	1,13 ± 0,10	1,35 ± 0,05	41,97
<i>I. pustulosa</i>	-	1,29 ± 0,12	1,61 ± 0,15	55,33
<i>G. proximum</i>	-	1,55 ± 0,13	2,16 ± 0,07	93,13
<i>G. spelaeum</i>	1,34 ± 0,16	1,58 ± 0,10	2,35 ± 0,09	122,81

Tabela 3.III. Duração (em dias) das fases de desenvolvimento embrionário observadas em *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, no goniosomatíneo de Guaricana (referido na tabela como *G. guaricana*), *G. proximum*, *G. spelaeum*, *L. zonata*, *P. ornatus*, *D. inermes*, *A. fuscopunctatus* e *Neosadocus* sp.. Dados referentes à *P. quinamavidensis* extraídos de Muñoz-Cuevas (1971). Na tabela: I – Clivagem; II – Formação da banda germinativa; III – Metamerização do prossoma; IV – Inversão; V – Organogênese larval; L – Fase larval; DET1 – Soma dos valores mínimos e máximos observados para cada fase; DET2 – Desenvolvimento embrionário completo observado no campo.

Espécie	I	II	III	IV	V	L	DET1	DET2
<i>G. proximum</i>	1 - 2	3 - 6	2 - 4	7 - 15	13 - 20	5 - 9	31 - 56	31 - 48
<i>G. spelaeum</i>	1 - 2	4 - 8	2 - 5	8 - 19	10 - 21	4 - 7	29 - 62	29 - 54
<i>A. leucopheus</i>	4 - 9		3 - 7	11 - 19	9 - 17	2 - 4	29 - 56	29 - 37
<i>I. pustulosa</i>	6 - 12		4 - 8	12 - 21	10 - 19	3 - 6	35 - 66	35 - 40
<i>G. guaricana</i>	2 - 7		1	7 - 9	5 - 7	6 - 8	21 - 32	21 - 27
<i>P. quinamavidensis</i>	10 - 20		3 - 5	8 - 13	7 - 20	7 - 18	35 - 76	37 - 70
<i>L. zonata</i>	28 - 37				9 - 15	6 - 12	43 - 64	39 - 53
<i>P. ornatus</i>	23 - 32				8 - 13	5 - 10	36 - 55	41 - 48
<i>D. inermes</i>	9 - 17*				7 - 13	6 - 9	22 - 39*	19* - 38
<i>A. fuscupunctatus</i>	-				≥ 11	5 - 8	≥ 16	
<i>Neosadocus</i> sp.	-				≥ 9	4 - 5	≥ 13	

* Há incerteza de cerca de 7 dias quanto à data de deposição da desova em *D. inermes*, podendo estar entre 9 -16 e 17 - 24 antes do início da organogênese larval.

Tabela 3.IV. Duração percentual de cada fase em relação à duração total do desenvolvimento embrionário (DET1) em *G. proximum*, *G. spelaeum*, no goniosomatíneo de Guaricana (referido na tabela como *G. guaricana*) *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *L. zonata*, *P. ornatus* e *D. inermes*. Dados referentes à *P. quinamavidensis* extraídos de Muñoz-Cuevas (1971). Na tabela: I – Clivagem; II – Formação da banda germinativa; III – Metamerização do prossoma; IV – Inversão; V – Organogênese larval; L – Fase larval.

Espécie	I	II	III	IV	V	L
<i>G. proximum</i>	3,2 - 3,6	9,7 - 10,7	6,4 - 7,1	22,5 - 26,8	35,7 - 41,9	16,0 - 16,1
	12,9 - 14,3					
	41,9 - 48,2					
<i>G. spelaeum</i>	3,2 - 3,4	12,9 - 13,8	6,9 - 8,1	27,5 - 30,6	33,9 - 34,5	11,3 - 13,8
	16,1 - 17,3					
	51,7 - 54,8					
<i>G. guaricana</i>	9,5 - 21,9		3,1 - 4,8	28,1 - 33,3	21,9 - 23,8	25,0 - 28,6
	47,6 - 53,1					
<i>A. leucopheus</i>	13,8 - 16,1		10,3 - 12,5	33,9 - 37,9	30,4 - 31,0	6,9 - 7,1
	62,1 - 62,5					
<i>I. pustulosa</i>	17,1 - 18,2		11,4 - 12,1	31,8 - 34,3	28,6 - 28,8	8,6 - 9,1
	62,1 - 62,9					
<i>P. quinamavidensis</i>	26,3 - 28,6		6,6 - 8,6	17,1 - 22,9	20,0 - 26,3	20,0 - 23,7
	50,0 - 60,0					
<i>L. zonata</i>	57,8 - 65,1				20,9 - 23,4	13,9 - 18,8
<i>P. ornatus</i>	58,2 - 63,9				22,2 - 23,6	13,9 - 18,2
<i>D. inermes</i>	40,9 - 43,6				31,8 - 33,3	23,1 - 27,3

Figura 3.1. Desovas de *G. spelaeum* (a) e *G. proximum* (b) em condições naturais, evidenciando o caráter heterogêneo desta última com relação ao estágio de desenvolvimento dos embriões.

Figura 3.2. Ataque por fungos em desovas no campo. (a,b) *I. pustulosa*; (c) *A. leucopheus* e (d) *G. proximum*.

Figura 3.3. (a) Ninfa do 4º instar de *Z. travassosi* sobre desova parcialmente devorada de *G. spelaeum*. (b) Detalhe aumentado com ovos destruídos durante a alimentação do heteróptero.

Figura 3.4. Embriões do goniosomatíneo de Guaricana durante a clivagem e formação da banda germinativa (a), na fase de metamerização do prossoma (b), durante a inversão do embrião (c,d), na organogênese larval (e,f,g) e na fase larval (h).

Figura 3.5 Ovos de *L. zonata* “escondidos” no substrato de deposição dos ovos no campo (a) e após sua transferência para papel absorvente (b).

Figura 3.6. Ovos de *L. zonata* (a, b, c) e *P. ornatus* (d, e, f) nas fases iniciais do desenvolvimento dos embriões (fases I a IV, a, d), durante a organogênese larval (b, e) e na fase de larva (c, f).

Figura 3.7. Embriões de *A. fuscopunctatus* (a,b,c) e *Neosadocus* sp. (d,e,f), nas fases mais iniciais em que foram trazidos (a,c), durante a organogênese larval (b,e) e na fase de larva (c,f).

Figura 3.8. Embriões de *D. inermes* durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (a,b), recentemente depositados (a) ou com cerca de 15 dias (b), durante a organogênese larval (c) e na fase de larva (d).

Figura 3.9. Valores percentuais mínimos (a) e máximos (b) da duração das fases em *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum*, *G. spelaeum*, no goniosomatíneo de Guaricana (referido na legenda como *G. guaricana*) e *P. quinamavidensis*. Dados de *P. quinamavidensis* modificados de Muñoz-Cuevas, 1971.

Figura 3.10. Valores percentuais mínimos (a) e máximos (b) da duração das fases em *D. inermes*, *L. zonata* e *P. ornatus*, com a inclusão em condições comparáveis dos valores para *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum*, *G. spelaeum*, no goniosomatíneo de Guaricana (referido na legenda como *G. guaricana*) e *P. quinamavidensis*. Dados de *P. quinamavidensis* modificados de Muñoz-Cuevas, 1971.

4 Discussão

4.1 Estrutura das Desovas e Redução de Ovos

As desovas analisadas em termos de contagem de ovos (tabela 3.1) revelaram que em *G. proximum* é adicionado maior número de ovos tardios, e em período mais longo, que em *G. spelaeum*. Como foi observado que em *G. proximum* há formação de haréns (Buzatto & Machado 2008) de fêmeas patrulhadas por machos “dominantes” (grandes e com pronunciado dimorfismo, sendo apenas 1 por harém), que são visitadas por machos oportunistas menores (e menos acentuadamente dimórficos) e eventualmente copulam com os mesmos durante sua guarda das desovas (Buzatto 2008), ovos adicionados após novas cópulas podem ser referentes aos sucessivos machos. Embora esse comportamento não tenha sido observado em *G. spelaeum*, machos “grandes e mais armados” também foram observados junto a fêmeas guardando posturas de ovos (M. C. Chelini, *com. pess.*) e fêmeas que já colocaram ovos foram observadas copulando novamente, não sendo possível saber se foi com o mesmo macho ou outro (Gnaschini 1995). Assim, por enquanto não é possível explicar tal diferença.

Ataques por predadores grandes (capazes de afugentar o guardião) podem ocorrer eventualmente, como observado em *G. spelaeum*, e nesses casos devem resultar na destruição total das desovas, ou pelo menos da maior parte dos ovos, e o conseqüente abandono do local pelo parental guardião. O desaparecimento de um pequeno número de ovos durante o desenvolvimento embrionário, entretanto, e sem o abandono da desova pelo adulto, pode estar relacionado com a ação de pequenos predadores oportunistas, que passariam despercebidos pelos adultos para se alimentar de um ovo por vez.

Contaminações por fungos também podem tomar a maior parte da desova, como observado em *I. pustulosa* (figura 3.2 a), e nesse caso todos os ovos contaminados ficam comprometidos (figura 3.2 b). Por outro lado, contaminações por fungos detectadas em *A. leucopheus* (figura 3.2 c) e *G. proximum* (figura 3.2 d), em grau menos avançado, desapareceram em observações subseqüentes, podendo indicar que existe, pelo menos nos casos mais amenos, algum mecanismo de extração dos fungos por parte do adulto. Nesse caso, a menor taxa de redução de ovos apresentada por *G. spelaeum* em relação a *G. proximum*, associada ao fato de ter sido verificada contaminação por fungos em todas as espécies epígeas e não ter sido observado tal fenômeno mesmo na grande amostragem de ovos em *G. spelaeum* ($n > 500$ ovos acompanhados), poderia estar indicando que as desovas em folhas estão mais vulneráveis ao ataque por fungos que em paredes de cavernas. Nesse cenário, ovos perdidos (DC – PE) supostamente corresponderiam a ovos extraídos pelo guardião para evitar a contaminação dos demais ovos, ou a ovos cujo córion foi rompido durante o processo de “limpeza” dos fungos.

4.2 Aumento Volumétrico dos Ovos

Como mencionado no capítulo 3, ovos de *A. leucopheus* e *I. pustulosa* apresentaram cerca de 50% de aumento no volume até o final do desenvolvimento embrionário, valores próximos à metade do observado nas espécies de Goniosomatinae, onde o volume dos ovos foi aproximadamente dobrado. Embora isto seja congruente com a proximidade filogenética das espécies, deve ser considerado também o tamanho mais próximo das mesmas: ovos (bem como animais adultos) das espécies de Goniosomatinae são maiores que ovos (e adultos) de *A. leucopheus* e *I. pustulosa*. Considerando-se, ainda, que não é incomum desovas das espécies de Goniosomatinae apresentarem mais de 100 ovos (depositados por uma única fêmea), ao passo que desovas de apenas uma fêmea (ou seja, desovas “parciais” incluídas nas desovas “compostas” guardadas pelos machos) em *A. leucopheus* e *I. pustulosa* raramente ultrapassam 50 ovos, existe base para se supor que, nas espécies em que o número de ovos depositados é maior, estes sejam depositados com menor volume, já que a energia disponível para a alocação de recursos para a prole deveria ser similar em todos estes casos. Sob este ponto de vista, ovos das espécies de Goniosomatinae teriam uma proporção menor de vitelo que os de *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, daí o menor volume apresentado pelos últimos.

Outro fator a ser considerado é o tamanho relativo das pernas em cada espécie, uma vez que, por serem maiores nas espécies de Goniosomatinae, é possível que requeiram maior volume para sua acomodação no interior do ovo, e então o maior aumento volumétrico do ovo destas não estaria refletindo um maior aumento proporcional do corpo do embrião, mas apenas um aspecto anatômico diferenciado entre estas espécies.

De qualquer modo, em *A. leucopheus* e *I. pustulosa* os valores encontrados para o aumento volumétrico relativo foram muito menores do que os observados em *G. proximum* e *G. spelaeum*, e a taxa de absorção de água no início do desenvolvimento dos Goniosomatinae excede em muito a observada nas espécies de nos Caelopyginae e Progonyleptoidellinae.

Em *G. spelaeum*, particularmente, o volume dos ovos mais do que dobra em relação aos ovos iniciais, e ao considerarmos os óvulos antes da fecundação este aumento atinge 207,69% até a eclosão dos ovos, embora sua fixação no etanol, em contraposição à medição dos ovos *in vivo* nos demais casos, possa ter influenciado esta proporção.

4.3 Padrões de Desenvolvimento Morfológico

Como foi previamente mencionado, eventos específicos foram selecionados para identificar o início de cada fase do desenvolvimento embrionário nas espécies estudadas, tendo em vista aspectos que pudessem ser identificados em observação externa dos ovos (considerando-se o desenho experimental empregado), e dadas diferenças observadas no padrão de

desenvolvimento durante o decorrer deste estudo em relação ao discutido na literatura, especialmente a *P. quinamavidensis*.

Assim, uma vez que não foi observada, para qualquer espécie, formação de uma faixa celularizada prévia ao surgimento dos primórdios apendiculares, tornou-se necessário utilizar a aparição do blastoderme celular para marcar o final da clivagem (I) e o início da formação da banda germinativa (II), embora com isso possa ter sido incluída parte da primeira fase nesta última. De maneira similar, o aparecimento das estrias transversais foi selecionado como marcando o início da metamerização do prossoma (III) a despeito de não ter sido observada nestas espécies, até este momento, condensação do material celular ou o início da formação das placas cefálica e anal. O início da inversão do embrião (IV), quando do desenvolvimento inicial dos apêndices, corresponde ao observado em *P. quinamavidensis*, entretanto nas espécies abordadas no presente estudo não é nesta fase que se inicia a pigmentação, e em *G. proximum* e *G. spelaeum* também as pernas não atingem pleno desenvolvimento nesta etapa, sendo que a formação do ceco digestivo tem início antes destes eventos. O início da formação do ceco digestivo foi selecionado como o início da organogênese larval (V) dos embriões tendo em vista sua fácil visualização externa e a descrição da mesma no início desta fase em *P. quinamavidensis*, já que o processo de formação do tubo cardíaco, nas espécies presentemente estudadas, tem início muito anterior, correspondendo mais proximamente a embriões na fase de inversão (IV). Uma vez que não seria possível, dada a metodologia empregada, reconhecer o primeiro batimento cardíaco, optou-se por utilizar a conclusão do padrão pigmentar das larvas como dando início à fase larval (L).

Como exposto no capítulo 3, somente em *G. proximum* e *G. spelaeum* foi possível observar todas as fases do desenvolvimento embrionário descritas na literatura, sendo que no goniosomatíneo de Guaricana, bem como em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, não fica evidente diferenciação externa entre a clivagem do embrião (I) e a formação da banda germinativa (II) no mesmo. Isto talvez se deva à coloração do vitelo nestas espécies de Goniosomatinae, já que a estrutura celular fica destacada no vitelo pardo de *G. proximum* e *G. spelaeum* (Anexo II, figuras 3, 6), mas não se evidencia contra o vitelo branco em *A. leucopheus* e *I. pustulosa* (Anexo I, figuras 4-5). No goniosomatíneo de Guaricana (figura 3.4), embora o vitelo apresente a coloração parda observada nos demais Goniosomatinae, a ausência de observações pode estar relacionada ao reduzido número de ovos acompanhados nesta espécie, já que parece existir um momento curto em que o blastoderme celular aparece de maneira evidente, como evidenciado pelo pequeno número de observações desta estrutura em *G. proximum* e *G. spelaeum*.

Além disso, em *L. zonata* e *P. ornatus* (figura 3.6), a menor transparência e/ou a espessura do córion, associados aos detritos aderidos ao mesmo, não permitiram a identificação das modificações morfológicas nos embriões, e somente a organogênese larval e a fase de larva

dentro do ovo foram passíveis de diferenciação, o mesmo ocorrendo com *D. inermes*. As pequenas amostras de ovos obtidas destas espécies, ademais, não permitiu a experimentação com metodologias alternativas, por exemplo a diafanização do córion através da imersão em óleo de parafina, como discutido na literatura (e.g., Juberthie 1964; Muñoz-Cuevas 1971).

Dentre as espécies que puderam ser acompanhadas de modo consistente, o padrão de pigmentação mostrou-se a diferença mais conspícua (capítulos 3.3 e 3.4), refletindo a diversidade encontrada nos adultos. Assim, observou-se certa consistência no padrão pigmentar de *G. proximum* e *G. spelaeum*, nos quais as larvas emergem com coloração marrom escura aproximadamente homogênea (Anexo II, figuras 33, 35), estando as principais diferenças relacionadas ao padrão temporal de difusão dos pigmentos. Não obstante, não foi observada coloração mais escura nas larvas em *G. proximum* em relação à *G. spelaeum*, como é o caso nos adultos.

Por outro lado, em *I. pustulosa* existem diferenças marcantes com relação a essas espécies, já que larvas emergem com coloração cinza escura nos apêndices e mais clara na região do cefalotórax, enquanto o opistossoma quase não apresenta pigmentos (Anexo II, figuras 30, 32), com um padrão rajado sutil marcando as tíbias e tarsos dos apêndices. Também em *A. leucopheus* o padrão completo apresenta concentração de pigmentos nos apêndices e, em menor grau, no cefalotórax (Anexo II, figuras 31, 33), mas nesta espécie o caráter rajado dos apêndices fica muito mais evidente, com as articulações apresentando-se em marrom e os artículos com coloração alaranjada. Assim, as espécies da subfamília Goniosomatinae apresentaram pigmentação escura homogênea, inclusive do opistossoma, em contraposição à concentração de pigmentos nos apêndices e cefalotórax (em menor grau) nos Caelopyginae e nos Progonyleptoidellinae, que por sua vez apresentam coloração diferente (entre si) e desenho específico.

A detecção de um dente do ovo em *I. pustulosa* (Anexo I, figuras 64, 71-72), em contraposição ao que se acreditava até o momento ser a regra em Laniatores, indica a necessidade da ampliação dos conhecimentos na área com fins de caracterização dos grupos em termos de seu desenvolvimento embrionário. Em *A. leucopheus* (Anexo I, figura 53) e *G. proximum* (Anexo II, figura 38), uma estrutura cônica e afilada e voltada para frente também aparece no início da fase V, como em *I. pustulosa* (Anexo I, figura 64), mas essa estrutura não permanece na fase larval, voltada para cima, caracterizando um dente de ovo, como ocorre em *I. pustulosa* (Anexo I, figuras 71-72). Certamente, a ampliação de estudos embrionários em Laniatores permitirá um melhor entendimento sobre a evolução dessa estrutura no grupo.

4.4 Temporização

Com relação à duração do período embrionário, todas as espécies apresentaram duração variando entre 30 e 60 dias (exceção feita ao goniosomatíneo de Guaricana) como visto na

tabela 3.III, parecendo ser esta a norma para ovos que não sofrem hibernação. As durações totais observadas parecem indicar que os ovos no campo estão sujeitos a temperaturas próximas da faixa ótima, visto que a duração observada no campo para o desenvolvimento embrionário como um todo (DET2, tabela 3.III) não difere muito da soma dos valores mínimos observados para cada uma das fases (menores valores em DET1, tabela 3.III), que supostamente correspondem ao “período ideal de desenvolvimento”. Ademais, a variação de temperatura durante o acompanhamento do desenvolvimento embrionário no campo (tabela 2.I) não apresentou extremos demasiados (com exceção de baixas temperaturas em alguns dias do mês de maio em 2006), estando as médias das temperaturas amostradas entre os 12 e 22 °C durante todo o período de acompanhamento, sugerindo que possivelmente temperaturas letais (baixas e altas) sejam raras em condições naturais, e que os embriões no campo podem permanecer, na maior parte do tempo, em condições favoráveis de temperatura.

Em comparação ao período embrionário em outros opiliões, os valores encontrados em todas as espécies apresentaram conformidade com os observados para *P. quinamavidensis* (único membro dos Laniatores previamente estudado) e alguns Eupnoi, como *Platybunus bucephalus*. Tal duração para o desenvolvimento dos embriões nas espécies aqui abordadas coloca-as em situação intermediária entre alguns Dyspnoi de rápido desenvolvimento (como *Paranemastoma silli*) e a longa duração observada em alguns Eupnoi (como *Odiellus gallicus*).

Quanto à seqüência de eventos transcorridos em cada fase, a diferença mais conspícua dentre as espécies estudadas diz respeito ao desenvolvimento das pernas. Como mencionado, em *A. leucopheus* e *I. pustulosa* os embriões atingem a organogênese larval (V) com pernas plenamente desenvolvidas, ao passo que em *G. proximum* e *G. spelaeum* o desenvolvimento das pernas só se completa dias depois de terminada a inversão do embrião, após o surgimento dos olhos e o início da pigmentação na placa cefálica. Como nos adultos de Goniosomatinae as pernas são proporcionalmente maiores que em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, isso pode estar ligado à necessidade de um período mais longo no desenvolvimento embrionário das mesmas. Esta conclusão tardia no desenvolvimento das pernas pode também ter relação com a maior duração absoluta da inversão (IV) nos Caelopyginae e Progonyleptoidellinae, se comparada à de *G. proximum* e *G. spelaeum*, e nesse caso o “encurtamento” da fase de inversão do embrião (IV), ou seja, o aparecimento mais precoce dos primeiros indícios do ceco digestivo em formação, estaria acompanhado da transferência de parte do desenvolvimento das pernas para a fase seguinte.

Ainda de modo geral, em *G. proximum* e *G. spelaeum*, bem como nas espécies de Mitobatinae, o período embrionário pode ter duração mais longa que as demais, porém o rápido desenvolvimento dos embriões no goniosomatíneo de Guaricana parece refutar a idéia de isso se tratar de uma característica relacionada à proximidade filogenética. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de se tratar de uma apomorfia nesta espécie. Por outro lado,

para a fase larval (L) dentro do ovo, esta espécie apresentou duração similar ou até superior às outras espécies estudadas. Os valores absolutos de duração de cada fase, nas demais espécies, parecem concordar aproximadamente, embora haja diferenças marcantes na correspondência relativa entre estes valores e a duração total do desenvolvimento embrionário em cada espécie, como discutido adiante.

Também *D. inermes* apresentou rápido desenvolvimento para os embriões. Nesse caso, além do já mencionado problema relativo à determinação da data de deposição dos ovos, a curta duração do período embrionário poderia ter relação com o tamanho das larvas e adultos, visto tratar-se da menor entre as espécies consideradas, e que não é incomum que espécies menores apresentem ciclos de vida mais acelerados que seus parentes maiores.

Quanto à duração de cada fase em relação ao período embrionário como um todo, há grande discrepância entre as espécies estudadas, como mostram as figuras 3.9 e 3.10. Cabe lembrar, contudo, que devem ser feitas reservas na comparação dos dados desta pesquisa com os resultados de *P. quinamavidensis*, já que no presente foram definidos eventos específicos (e em alguns casos diferentes) da seqüência observada na espécie descrita na literatura.

Não obstante, observa-se na figura 3.9 que as fases de clivagem (I) e formação da banda germinativa (II) em *P. quinamavidensis* (modificado de Muñoz-Cuevas 1971) são responsáveis pela maior parte do tempo requerido para o desenvolvimento dos embriões, sendo que a metamerização do prossoma (III) corresponde à fase mais curta e que as fases de inversão (IV), organogênese larval (V) e de larva (L) apresentam duração similar e correspondendo quase à duração das duas primeiras fases do desenvolvimento dos embriões tomadas em conjunto. Já em *G. proximum* e *G. spelaeum*, as fases mais longas (em termos relativos) foram a organogênese larval (V) e, em menor grau, a inversão (IV). As fases de clivagem (I) e formação da banda germinativa (II) nestas espécies, bem como a fase larval (L) dentro do ovo, tiveram pequena duração relativa se comparadas aos valores observados em *P. quinamavidensis*. Em *A. leucopheus*, *I. pustulosa* e no goniosomatíneo de Guaricana, a fase mais longa correspondeu à inversão do embrião, seguida pela organogênese larval em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, e pela fase de larva no goniosomatíneo de Guaricana. As fases I e II somadas, bem como a fase III, apresentaram duração relativa intermediária em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, ao passo que a fase larval mostrou-se a mais curta nestas espécies. No goniosomatíneo de Guaricana, por outro lado, as fases I e II mostraram-se grande variação, enquanto que a fase III, levando apenas um dia nesta espécie, correspondeu à menor duração relativa.

Embora o tempo decorrido até a organogênese larval corresponda a 40 – 65% da duração total do desenvolvimento embrionário em todas as espécies estudadas (figura 3.10), os valores observados em *D. inermes* apresentaram-se menores que os das demais espécies, com um correspondente aumento das fases V e L. Em termos da organogênese larval, *D. inermes*

apresentou resultados próximos aos de *A. leucopheus*, *I. pustulosa*, *G. proximum* e *G. spelaenum*, embora a duração relativa da fase de larva esteja mais próxima do obtido para *P. quinamavidensis* (e o goniosomatíneo de Guaricana), sendo consideravelmente maior que o das demais espécies. Nesse sentido, *L. zonata* e *P. ornatus* apresentaram resultados similares entre si, destacando-se pela curta duração relativa da organogênese larval (V) nestas espécies, de modo similar ao observado em *P. quinamavidensis*. As espécies de Mitobatinae apresentaram longa duração até o início da organogênese larval, de modo similar ao ocorrido em *A. leucopheus* e *I. pustulosa*. A fase larval em *L. zonata* e *P. ornatus* apresentou duração relativa média se comparada com as demais espécies.

4.5 Considerações Finais

Em termos gerais, parece haver mais congruência no desenvolvimento dos embriões entre as espécies mais aparentadas e/ou com o mesmo tipo de cuidado parental (ou ausência do mesmo), tanto em termos morfológicos como na questão da duração das etapas e do período embrionário como um todo. Assim, os embriões de *G. proximum* e *G. spelaenum* apresentam desenvolvimento bastante similar, diferindo das demais espécies tanto em termos morfológicos (como o desenvolvimento das pernas e a estrutura visível do blastoderme celular) como na questão da duração das fases e do desenvolvimento embrionário completo. O mesmo ocorre entre *A. leucopheus* e *I. pustulosa*, que apresentam padrão de temporização e período total de desenvolvimento característico (e distinto das demais espécies) e aspectos morfológicos próprios. Também as espécies de Mitobatinae apresentam congruência com relação às durações absolutas e relativas das fases, bem como tempo similar para o período embrionário como um todo. Em outras palavras, espécies com cuidado paterno apresentam um padrão distinto daquelas com cuidado materno, e ambos os padrões se distinguem do observado para as espécies com ausência de cuidado parental.

Por outro lado, os dados referentes à temporização do período embrionário do goniosomatíneo de Guaricana parecem se assemelhar mais àqueles dos Mitobatinae que aos dos demais Goniosomatinae, enquanto que os valores obtidos para *D. inermes* seguem um padrão próprio, mais aproximado em alguns pontos do observado para o goniosomatíneo de Guaricana e em outros momentos do apresentado por *P. quinamavidensis*.

5 Conclusões

O desenvolvimento embrionário nas espécies da família Gonyleptidae estudadas pelo presente segue, em linhas gerais, o modelo das espécies descritas na literatura, estando a principal diferença entre as espécies relacionada ao padrão pigmentar e a sequência em que aparece.

Foi observada deposição de ovos posterior ao evento inicial de oviposição nas espécies com cuidado materno, correspondendo a 4,0% em *G. proximum* e 1,4% em *G. spelaeum*, e a taxa de emergência de larvas é menor em *G. proximum* (91,8%) que em *G. spelaeum* (97,6%).

O desenvolvimento dos embriões nas espécies estudadas teve duração de 30 a 65 dias, com exceção do goniosomatíneo de Guaricana, que apresentou curto período embrionário (entre 20 e 30 dias).

De modo geral, a clivagem teve duração de 1 a 2 dias, a formação da banda germinativa de 3 a 8 dias (sendo que a soma destas fases variou entre 4 e 12 dias), a metamerização do prossoma de 2 a 8 dias, a inversão do embrião de 7 a 21 dias, a organogênese larval de 7 a 21 dias e a fase larval de 2 a 12 dias (na espécie da Represa Guaricana houve duração de 2 a 7 dias para as fases I e II, 1 dia para a fase III, 7 a 9 dias para a fase IV, 5 a 7 dias para a fase V e 6 a 8 dias para a fase larval).

Foi constatada a presença de um dente do ovo em espécies de Progonyleptoidellinae, ao contrário do esperado nos Laniatores, denotando a necessidade de estudos mais aprofundados de embriões da subordem.

Algumas diferenças foram observadas entre as espécies estudadas, a saber:

O aumento de volume dos ovos durante o período embrionário é menor em *Ampheres leucopheus* (42%) e *Iporangaia pustulosa* (55%) que nas espécies de Goniosomatinae (93% em *Goniosoma proximum* e 122% em *Goniosoma spelaeum*).

A transparência do córion varia entre as espécies estudadas, bem como a coloração do vitelo; o contraste entre a coloração escura deste e os blastômeros permitiu a identificação do blastoderme celular em *G. proximum* e *G. spelaeum*.

O desenvolvimento das pernas requer proporcionalmente mais tempo em *G. proximum* e *G. spelaeum* que nas espécies de Caelopyginae ou Progonyleptoidellinae estudadas, como evidenciado pela continuação do desenvolvimento das mesmas após o início da organogênese larval.

O padrão pigmentar é característico para cada espécie em termos morfológicos e de grau, bem como a sequência de eventos no processo e o momento em que ocorrem.

Essas diferenças podem estar relacionadas diretamente com a relação de parentesco entre as espécies, ou apenas com o tipo de cuidado parental e/ou o tamanho individual (tanto de ovos como de adultos), sendo necessários mais estudos, abrangendo outras espécies (e grupos) de Gonyleptidae, para que se possa estabelecer uma relação de causalidade.

6 Literatura Citada

- ANDERSON, D. T., 1973. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. International Series of Monographs in Pure and Applied Biology 50:1– 451.
- AVRAM, S., 1973. Contribution à la connaissance du développement embryonnaire et postembryonnaire chez *Nemastoma* cf. *sillii* Herrman (Opiliones, Nemastomatidae). Pp. 269 – 303, *In* Livre de cinquantenaire de l'Institut de Spéologie "Émile Racovitza" (T. Orghidan, ed.). Academia Republicii Socialiste Romania, Bucuresti.
- BACHMANN, E. & M. SCHAEFER, 1983. Notes on the life cycle of *Phalangium opilio* (Arachnida: Opiliones). Verhandlungen des naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF) 26:255–263.
- BALBIANI, M., 1872. Mémoire sur le développement des Phalangides. Annales des Sciences Naturelles (5) 16:1-28 + pl.1&2.
- BOWDER, L. W., ERICKSON, C. A. & W. R. JEFFERY, 1991. Developmental biology. 3rd Edition. Saunders College, Philadelphia. 754 p.
- BUZZATO, B. A., 2008. Biologia reprodutiva do opilião *Acutisoma proximum* (Arachnida: Opiliones): estratégias alternativas de acasalamento em machos e cuidado parental em fêmeas. Dissertação de Mestrado, Unicamp - Campinas / SP.
- BUZZATTO, B. A. & G. MACHADO, 2008. Resource defense polygyny over the course of the reproductive season of a Neotropical harvestman. Behavioral Ecology and Sociobiology 63: 85 – 94.
- DALY, H. V., DOYEN, J. T. & A. H. PURCELL III, 1998. Introduction to insect biology and diversity. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford. 680 p.
- FAUSSEK, V., 1888. Ueber die embryonale Entwicklung der Geschlechtsorgane bei der Afterspinne (*Phalangium*). Biologisches Zentralblatt 8: 359 – 363.
- FAUSSEK, V., 1891. Zur Embryologie von *Phalangium*. Zoologische Anzeichnungen 14: 3 – 5.
- FAUSSEK, V., 1892. On the anatomy and embryology of the Phalangidae. The Annals and Magazine of Natural History, London, (6) 9: 397 – 405. (summary of Zur anatomie und Embryologie der Phalangiden. Trav. Soc. Imp. Natur. St. Pétersb. 22; translation from Zur Anatomie und Embryologie der Phalangiden. Biologisches Zentralblatt 12:1–8, 1892).
- GILBERT, S. F., 1995. Biologia do desenvolvimento. 2ª Edição (*Do original: Developmental biology. 3rd Edition*). Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 563 p.

- GIRIBET, G., EDGECOMBE, G. D., WHEELER, W. C. & C. BABBITT, 2002. Phylogeny and systematic position of Opiliones: A combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics*, 18: 5 – 70.
- GIRIBET, G. & A. B. KURY, 2007. Phylogeny and biogeography. *In*: Harvestmen: the biology of Opiliones. Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, eds., pp. 62 – 87. Harvard University Press, Cambridge.
- 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). *J. Zool.* 239: 417-435.
- GNASPINI, P., 2007. Development. *In*: Harvestmen: the biology of Opiliones. Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & G. Giribet (editors). Harvard University Press, Cambridge. 597 p.
- GNASPINI, P., DA SILVA, M. B. & F. C. PIÖKER, 2004. The occurrence of two adult instars among Grassatores (Arachnida: Opiliones) - A new type of life cycle in arachnids. *Invertebrate Reproduction and Development*, 45(1): 29-39.
- GRUBER, J., 1993. Beobachtungen zur Ökologie und Biologie von *Dicranolasma scabrum* (HERBST) (Arachnida: Opiliones). Teil I. - *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 94/95 B: 393 - 426.
- HARA, M. R., GNASPINI, P. & G. MACHADO, 2003. Male egg guarding behavior in the neotropical harvestman *Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922) (Opiliones, Gonyleptidae). *Journal of Arachnology* 31: 441-444.
- HENKING, H., 1886. Untersuchungen über die Entwicklung der Phalangiden. Part I. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 45:86–175.
- HILLYARD, P. D., 2005. Harvestmen. *Synopses of the British Fauna*, 4. 3rd edition. Ed. Crothers, J. H. & P. J. Hayward. 167 p.
- HÖLM, A., 1947. On the development of *Opilio parietinus* Deg. *Zoologiska Bidrag från Uppsala* 25: 409 – 422.
- IMMEL, V., 1955. Einige Bemerkungen zur Biologie von *Platybunus bucephalus* (Opiliones, Eupnoi). *Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* 83: 475 – 484.
- JAWOROWSKI, A., 1891. Ueber die Extremitäten bei den Embryonen der Arachniden und Insecten. *Zoologischer Anzeiger* 14: 164 – 169, 173 – 176.

- JUBERTHIE, C., 1960. Action de différentes températures constantes sur le développement des oeufs de l'Opilion *Odiellus gallicus* E. S. Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences 250: 2079 – 2081.
- JUBERTHIE, C., 1964. Recherches sur la biologie des opilions. Annales de Spéléologie 19: 5 – 238.
- JUBERTHIE, C., 1965. Données sur l'écologie, le développement et la reproduction des Opilions. Revue d'Écologie et Biologie du Sol 2: 377 – 396.
- KARAMAN, IVO M., 2005. Evidence os spermatophores in cyphophtalmi (Arachnida, Opiliones). Revue Suisse de Zoologie, Genève, 112 (1): 3 – 11.
- KÄSTNER, A., 1935. Opiliones. In Kukenthal, W. G. (ed.). Handbuch der Zoologie 3/2: 300 – 393.
- MACHADO, G., 2002. Maternal care, defensive behavior, and sociality in neotropical *Goniosoma* harvestmen (Arachnida, Opiliones). Insectes Sociaux 49: 388 – 393.
- MACHADO, G. & R. MACÍAS-ORDÓÑEZ, 2007. Reproduction. In: Harvestmen: the biology of Opiliones. Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & G. Giribet (editors). Harvard University Press, Cambridge. 597 p.
- MACHADO, G. & P. S. OLIVEIRA, 1998. Reproductive biology of the neotropical harvestman (*Goniosoma longipes*) (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae): mating, oviposition behaviour, brood mortality, and parental care. Journal of Zoology 246: 359 – 367.
- MACHADO, G. & R. L. G. RAIMUNDO, 2001. Parental investment and the evolution of subsocial behaviour in harvestmen (Arachnida: Opiliones). Ethology, Ecology and Evolution 13: 133 – 150.
- MACHADO, G., REQUENA, G. S., BUZATTO, B. A., OSSES, F. & L. M. ROSSETTO, 2004. Five new cases of paternal care in harvestmen (Arachnida: Opiliones): Implications for the evolution of male guarding in the neotropical family Gonyleptidae. Sociobiology 44: 577 – 598.
- MACHADO, G., PINTO-DA-ROCHA, R. & G. GIRIBET, 2007. What are harvestmen? pp. 1 – 13. In: Harvestmen: the biology of Opiliones. Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & G. Giribet (editors). Harvard University Press, Cambridge. 597 p.
- MARTENS, J., 1965. Verbreitung und Biologie des Schneckenkankers *Ischyropsalis hellwigi*. Natur und Museum 95: 143 – 149.
- MARTENS, J., 1976. Genitalmorphologie, System und Phylogenie der Weberknechte (Arachnida, Opiliones). Entomologia Germanica 3: 51 – 68.

- MARTENS, J., HOHEISEL, U. & M. GÖTZE, 1981. Vergleichende Anatomie der Legeröhren der Opiliones als Beitrag zur Phylogenie der Ordnung (Arachnida). Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 105: 13 – 76.
- MORITZ, M., 1957. Zur embryonalentwicklung der Phalangiiden (Opiliones, Palpatores) unter besonderer Berücksichtigung der äusseren Morphologie, der Bildung des Mitteldarmes und der Genitalanlage. Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 76: 331 – 370.
- MORITZ, M., 1959. Zur embryonalentwicklung der Phalangiiden (Opiliones; Palpatores). II. Die Anlage und Entwicklung der Coxaldrüse bei *Phalangium opilio* L. Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 77: 229 – 240.
- MUÑOZ-CUEVAS, A., 1971. Étude du développement embryonnaire chez *Pachylus quinamavidensis* (Arachnida, Opiliones, Laniatores). Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle (2) 42: 1238 – 1250.
- MUÑOZ-CUEVAS, A., 1973. Embryogenèse, organogenèse et rôle des organes ventraux et neuraux de *Pachylus quinamavidensis* Muñoz (Arachnides, Opilions, Gonyleptidae). Comparaison avec les Annélides et d'autres Arthropodes. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle (3) 196: 1517 – 1537.
- PABST, W., 1953. Zur biologie der mitteleuropäischen Troguliden. Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere 82: 1 – 46.
- PFEIFER, H., 1956. Zur Ökologie und larvalsystematik der Weberknechte. Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin 32: 59 – 104.
- PHILLIPSON, J., 1959. The seasonal occurrence, life histories and fecundity of Harvest-spiders (Phalangida, Arachnida) in the neighborhood of Durham city. Entomologist's Monthly Magazine 95: 134 – 138.
- PINTO-DA-ROCHA, R., 2002. Systematic Review and Cladistic Analysis of the Brazilian Subfamily Caelopiginae (Opiliones: Gonyleptidae). Arquivos de Zoologia 36 (4): 357 – 464.
- PINTO-DA-ROCHA, R., MACHADO, G. & G. GIRIBET 2007. Harvestmen: the biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. 597 p.
- PURCELL, W. F., 1892. Über den Bau und die Entwicklung der Phalangiden-Augen. Zoologischer Anzeiger 15: 461 – 465.
- RAMIRES, E. N. & A. A. GIARETTA 1994. Maternal care in a neotropical harvestman, *Acutisoma proximum* (Opiliones, Gonyleptidae). Journal of Arachnology 22: 197 – 180.

- SCHIMKEWITSCH, W., 1898. Über die Entwicklung des Darmkanals bei einigen Arachniden. Trav. Soc. Imp. Natur. Saint Pétersbourg, 29: 25.
- SHULTZ, J. W., 1998. Phylogeny of Opiliones (Arachnida): an assessment of the "Cyphopalpatores" concept. Journal of Arachnology 26: 257 – 272.
- SHULTZ, J. & R. PINTO-DA-ROCHA, 2007. Morphology and functional anatomy. *In*: Harvestmen: the biology of Opiliones. Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & G. Giribet (editors). Harvard University Press, Cambridge. 597 p.
- TISCHLER, W., 1967. Zur Biologie und Ökologie des Opilioniden *Mitopus morio* F. Biologisches Zentralblatt 86: 473 – 484.
- WILLEMART, R. H., 2001. Egg covering behavior of the neotropical harvestman *Promitobates ornatus* (Opiliones Gonyleptidae). The Journal of Arachnology 29: 249 – 252.
- WILLEMART, R. H. & P. GNASPINI, 2004. Breeding biology of the caverniculous harvestman *Goniosoma albiscriptum* (Arachnida: Opiliones: Laniatores): sites of oviposition, egg batches characteristics and subsocial behaviour. Invertebrate Reproduction and Development, 45: 15 – 28.
- WINKLER, D., 1957. Die Entwicklung der äusseren Körpergestalt bei den Phalangiidae (Opiliones). Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin 33: 355 – 389.
- YOSHIKURA, M., 1975. Comparative embryology and phylogeny of Arachnida. Kumamoto Journal of Science 12: 71 – 142.

ANEXO 1

Embryonic development of *Ampheres leucopheus* and *Iporangaia pustulosa* (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae)

ABSTRACT. The first studies concerning the embryonic development of harvestmen started in the late XIX century. Mostly, these studies focused on holarctic species, and only three species of the suborder Laniatores (the largest, among the four suborders considered presently) were studied – two from Europe and one from the Americas: *Pachylus quinamavidensis*, a pachyline gonyleptid from Chile, studied in the laboratory in France. Moreover, the last studies on embryology of harvestmen were made during the late 1970s. Aiming at filling a gap of more than 30 years in the study of embryology of harvestmen, and adding a comparative component, this study focused on the embryonic development of *Ampheres leucopheus* (Gonyleptidae Caelopyginae) and *Iporangaia pustulosa* (Gonyleptidae Progonyleptoidellinae). The embryonic development was followed in the field, by taking daily photographs of different eggs from a number of egg batches. When laid, eggs of *A. leucopheus* and of *I. pustulosa* have approximately 1.13 mm and 1.30 mm in diameter, respectively, and the second is involved in a large amount of mucus. During embryogenesis eggs grow, mainly due to water absorption at the beginning of the process, and the eggs of these species reach a diameter of about 1.35 mm and 1.59 mm, respectively, close to hatching. It took, in *A. leucopheus* and *I. pustulosa*, respectively, 29-56 days and 35-66 days from egg laying to hatching. For the description of the embryonic development we use photographs from the field, SEM micrographs and histological analysis. This allowed us to document, for the first time in harvestmen literature, the progression of structures and pigmentation directly from live embryos in the field, and also to record microstructures such as the presence of perforations in the cuticle of the embryo in the place where eyes are developing, and to illustrate the presence of the exoskeleton of the first nymph already inside the exoskeleton of the developing embryo, and the development of the germinal band. Yet, contrary to what was expected in the literature, we record an egg tooth in one of the studied laniatoreans.

KEY WORDS: *egg size; embryology; duration of embryonic phase; harvestmen; germinal band*

INTRODUCTION

Harvestmen are arachnids characterized by having the prosoma partially fused to the opistosoma, a pair of exocrine glands opening at the sides of the body, and the presence of a penis and an ovipositor, respectively, in males and females, for direct sperm transfer and egg laying. Presently, four suborders are recognized: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi and

Laniatores, being the latter the largest (about 3800 species) and represented mostly by tropical species, mainly in the Neotropics (e.g., Machado et al 2007, Shultz & Pinto-da-Rocha 2007, Giribet & Kury 2007). Most studies concerning harvestman focused on holarctic species, but the number of studies concerning Neotropical laniatoreans have increased in the last two decades and led to important discoveries and some reinterpretation of the previous knowledge about the group. A concise summary about harvestmen has been recently published (see Pinto-da-Rocha et al 2007).

Studies concerning the embryonic development of harvestmen started in the late XIX century (see Gnaspini 2007 for a review) and reached its maximum mainly between the 1950s and middle 1970s (Holm 1947, Pabst 1953, Immel 1954, 1955, Moritz 1957, 1959, Winkler 1957, Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971, 1973, Avram 1973). As expected at that time, the great majority of studies dealt with temperate holarctic species, mostly of Eupnoi and, on a smaller scale, Dyspnoi. The only laniatorean exceptions were the European *Scotolemon lespesi* Lucas 1860 and *Holoscotolemon querilhaci* (Lucas 1864), both briefly studied by Juberthie (1964), and *Pachylus quinamavidensis* Muñoz-Cuevas 1969 (Gonyleptidae Pachylinae), a Chilean species with maternal care and the behavior of covering eggs with debris (Juberthie & Muñoz-Cuevas 1971); its embryology was studied by Muñoz-Cuevas (1971) in the laboratory in France. Actually, most studies were not complete, being made in reference to previous descriptive papers (such as those from Holm 1947, and also Moritz 1957 and Winkler 1957), thus not allowing adequate comparisons. After the 1970s, no study was published focusing on the embryology of harvestmen. A larger number of papers cite the duration of the embryonic phase (see Gnaspini 2007, for a review) but do not provide a description of the embryology.

The more recent papers among those cited above adopted the phases of embryonic development described for *Odiellus gallicus* Simon 1879 (Eupnoi) by Juberthie (1960, 1964, 1965), which was similar to the scheme used for spiders. In that scheme, five distinct phases were identified during the embryonic development: cleavage (phase I), germ band formation (II), metamerization of the prosoma (III), inversion (IV) and larval organogenesis (V). According to Holm (1947, and references therein), the cleavage in harvestmen is superficial, and early in the embryonic development a continuous layer of flat cells with small nuclei is present, as well as deeper situated and larger nuclei; then a spot appears in the blastoderm, representing an early genital rudiment, after what the formation of the germ band can be observed. The metamerization of the prosoma is characterized by the condensation of cellular material on the ventral side of the yolk mass, followed by the early development of the appendages primordia and the organization of the cephalic and anal plates, with the segmentation of the embryo in six somites (Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971). The inversion phase is marked by the appearance of the abdominal somites, together with the formation of the ocularium (= eye mound), the oral orifice and the claws, with the chelicerae approaching the medium-anterior

plane and the full development of the appendages, as well as the beginning of the pigmentation process (Muñoz-Cuevas 1971). The larval organogenesis phase includes the development of the digestive cecum and the differentiation of the eyes and the heart, with further pigmentation of the embryo and, when present, the formation of the hatching tooth (or teeth, when paired) (Immel 1955, Muñoz-Cuevas 1971). The first heartbeat was considered the starting point of the larval phase (phase L), still inside the egg. In this phase there is an additional pigmentation of the embryo and the preparation for hatching. After hatching, the larva takes a long (in Cyphophthalmi) or short time (in the other suborders) to molt into the first nymph stage.

Considering the long gap since the last papers about the embryology of harvestmen were produced, and the low number of studies focusing on laniatorean harvestmen, the present paper aims at retrieving the study of harvestmen embryology, on a comparative basis, focusing on two Neotropical species.

MATERIALS AND METHODS

The present study focused on two Neotropical species of gonyleptid harvestmen, *Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922) (Caelopyginae) (Fig. 1) and *Iporangaia pustulosa* Mello-Leitão 1935 (Progonyleptoidellinae) (Fig. 2). It was conducted in the field at Intervales State Park, an Atlantic Rain Forest reservation in southern São Paulo state, Brazil (see Gnaspini 1996).

Two field trips were conducted in consecutive years (2006 and 2007), from January to March, since previous observations showed that there is a reproductive peak of these species during the warm and humid season (summer). Respectively, nine and four egg batches (from multiple oviposition events) of *A. leucopheus* and *I. pustulosa* were selected, allowing the observation of more than 200 individual eggs per species. The multiple events nature of egg batches is related to the fact that the studied species present paternal care, and the male taking care of eggs may copulate to other females subsequently visiting that spot (e.g., Hara et al 2003).

To document the embryonic development from egg laying to hatching, 20-30 photographs were taken daily directly from each egg batch, in different positions and angles, using a Nikon D100 Digital Camera (6.1 Mpix) coupled to a 105 mm Macro lens with two intermediate rings, aiming at a large magnification. In addition, some eggs in different embryonic phases were collected in 70% ethanol and taken to the laboratory for analysis under SEM. Since the embryos were protected inside the eggshell, no previous cleaning treatment was performed. The material was dehydrated in a series of 70-80-90% ethanol, for 15 minutes in each concentration, and in three sessions of 10 minutes each in 100% ethanol, being taken afterwards to the "Critical Point Dryer BAL-TEC CPD 030". Afterwards, the material was mounted on a stub and taken to gold coating in the "Sputter Coater Balzer SCD 50". The

material was then examined under the ZEISS DSM 940 SEM of the Electronic Microscopic Laboratory of IBUSP. Yet, for the recognition of first phases, we used traditional H-E histological techniques.

For the recognition of the different phases, we followed Muñoz-Cuevas (1971). However, since we noticed, in the species studied herein, a different sequence in the group of events described by that author (as will be treated in Results and Discussion), we decided to elect single events as representatives of the beginning of such phases (especially concerning timing of each phase for the comparison among species), namely: we here establish that phase III starts when parallel ridges are first seen over the embryo, phase IV starts when the projections which will develop into appendages appear, phase V starts with the beginning of the formation of the digestive ceca, and phase L starts when pigmentation pattern is completed. Since some of these features appear on the surface and others appear inside the embryo, our descriptions are based both on the photographs taken from the field (in which all features can be seen due to the transparency of the eggshell), and on the SEM photographs (which only show surface features, but with more details).

The following codes are used in figures (see descriptions in the text): ch = chelicera; dc = digestive ceca; es = eggshell (= chorion); et = egg tooth; gc = germ cells; lb = labium (= lower lip); l1-l4 = leg I to leg IV; pd = pedipalp; y = yolk. For the photographs, we indicate the range in days in which that given pattern could be recognized in the field.

RESULTS

Eggs of *A. leucopheus* and *I. pustulosa* are laid with an average of 1.13 ± 0.10 mm and 1.30 ± 0.12 mm in diameter ($N = 10$), respectively, and the eggs of the second species are involved in a thick layer of mucus (Figs. 1, 3, 4[left], 5[left]). There is an initial increase in volume (and weight) of the eggs, probably due to absorption of water, and a slight additional growth during embryogenesis. Close to hatching the eggs measured 1.35 ± 0.05 mm and 1.59 ± 0.12 mm in diameter ($N = 10$), in *A. leucopheus* and *I. pustulosa*, respectively (Figs. 4[right], 5[right]). These values represent a relative size of ~25-30% in relation to the length of the dorsal scute of the females of both species. The eggshell in both species is completely transparent, aiding the detailed observation of the embryonic development.

The appearance of a visible mass of germ cells, as described for other species (Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971, 1973), was not observed in the present study. Hence, there are no visible external changes in the embryo between the cleavage and germ band formation phases (phases I and II) (as in Figs. 4[left], 5[left]), and, for our purposes, they will be treated as a single phase. Actually, other authors (e.g., Muñoz-Cuevas 1971 and Avram 1973) also mentioned the difficulty to finely observe phases I and II and treat them together. In turn, histological preparations confirmed that recently laid eggs of both species (therefore, in phase I)

are completely filled with yolk (red granules as in Fig. 34); afterwards, already in phase II (also in both species), a proliferation of cells starts at the ventral surface of the embryo (“gc”, in purple, as in Fig. 35), expanding laterally (Fig. 36) towards the end of phase II, partially involving the yolk mass (“y”). Yet, we made SEM studies of the eggs (surface and interior) that showed “globules” inside the egg (Figs. 37-38), which we recognized as yolk granules, since no cell was observed inside the egg in our histological preparations (Figs. 34-36). No evidence of a cumulus could be detected in early embryos.

The first visible external changes identified on embryos of both *A. leucopheus* and *I. pustulosa* appear on the prosoma metamerization phase (phase III), as a series of parallel ridges on the two opposite sides of the embryo (Figs. 6, 18), which appear simultaneously. Next, at the inversion phase (phase IV – Figs. 7-11, 19-23, 39-41, 43-48, 55, 57, 59, 61-68), the appendages primordia appear, in the form of six pairs of small protuberances on the ventral face of the embryo. Afterwards, these protuberances develop further to reach 0.7 ± 0.2 mm in length, when their segmented nature may already be noticed (Figs. 9, 21). With growth the appendages tend to bend towards each other and to occupy a larger space, and the volume of the body is progressively reduced and it assumes a more oval, ventrally flattened shape. This is followed by a reduction of the inner yolk mass. A longitudinal tube representing the heart begins to form on the dorsal face of the embryo, dividing the body into two lateral lobes, in which initially two to four bulges mark the beginning of the appearance of the abdominal somites.

At the beginning of phase V (larval organogenesis – Figs. 12-17, 24-29, 42, 49-54, 56, 58, 60, 69, 70) the digestive ceca become visible (“dc” as in Figs. 13, 25). After reaching full development, the appendages assume a characteristic disposition, with the chelicerae in an anterior-lateral position, the pedipalps and legs I and II extended laterally towards the ventral region of the embryo, and the hind legs surrounding the posterior region of the embryo and with its extremities ventrally covering the endings of legs I and II and of the pedipalps. Whereas the patellae of legs II-IV have a “dorsal” position (as in Figs. 46, 51-53), those of the legs I and pedipalps have a “lateral” position (Figs. 46, 65). Legs II are longer than legs III and IV; therefore the position of the patellae of legs II are easily recognized in the developing embryo (e.g., Figs. 28, 53). In turn, whereas the tarsi of legs I and II follow a direction transverse to the longitudinal axis of the body, in such a way that those from right and left sides meet ventrally (as in Figs. 44, 50), the tarsi of legs III and IV follow the longitudinal axis of the body and converge frontally, meeting together near the labium, as they pass on top of legs I and II (Figs. 44, 50, 61). Therefore, whereas the tibia and tarsus of leg II follow a straight “lateral” route descending from the patella toward the apex of the leg, those of legs III and IV descend laterally until they almost reach the ventral axis, where they bend towards the anterior region.

While the body progressively elongates and flattens, the lateral lobes of the posterior end of the body become rounded and approach each other, whereas the lateral lobes of the cephalic region widen and separate from each other, defining between them an ocularium with eyes, initially in a very subtle way. Afterwards, together with their increase in size and pigmentation, the eyes assume an elongate shape, with their anterior margins more separate from each other than the posterior margins. At this point, abdominal segments can be recognized simultaneously (see Figs. 51-52).

The pigmentation process starts with slight differences between the two species studied. In *A. leucopheus*, pigmentation starts at the base of the appendages, and the cephalic plate appears only as a light contour surrounding the eyes. In *I. pustulosa*, pigments also start to show at the basis of each appendage, but the cephalic plate is formed by darker disks surrounding white contours around the eyes. In both cases, progressive pigmentation of the appendages follows, always more intensively in *I. pustulosa*. At this point, the structure of the cephalic plate has become evident. In *A. leucopheus*, the legs are light orangish-brown, and the dorsal scute developed light grayish-brown spots, whereas in *I. pustulosa*, the legs are dark orangish-brown and the dorsal scute is covered by larger purplish-brown spots.

At the end of this phase and beginning of the larval phase, pigmentation pattern of the larva is established (Figs. 30, 31), with *A. leucopheus* keeping the pattern described above, and *I. pustulosa* darkening even more, reaching a very dark brownish-gray pattern covering most of the body and legs. Around 20 minutes after hatching the larvae (Figs. 32, 33) of both species pass through their first molt, resulting in the appearance of the first nymphs. Probably because of this short term, “free-living” larvae already represent pharate first nymphs, as can be seen in Fig. 71 – the pharate state actually appears early in the embryonic development, since it is already recognized in phase V (as in Fig. 60). In addition, although one of the known apomorphic traits of Grassatores within Opiliones is the presence of two tarsal claws in legs III and IV of nymphs and adults (see, e.g. Gnaspini 2007), the larvae (and also early embryos – see Fig. 66) present only one tarsal claw in these legs.

Contrary to what was considered to be a rule among Laniatores, which were expected to lack egg teeth (see Gnaspini 2007), we detected one egg tooth in *I. pustulosa*. This egg tooth is more pronounced at the beginning of phase IV, as a pointed projection directed “forward” (= towards the chelicerae) and raising from a smooth plate located just above the base of chelicerae (as in Fig. 64, “et”), the clypeus. Before hatching the apex is directed upward (as in Figs. 71-72, “et”). In *A. leucopheus*, a pointed “forward” projection also appears in the clypeus at the beginning of phase IV, and keeps the same morphological pattern throughout phase V (as in Fig. 53, inset).

Table 1 summarizes the minimum and maximum duration values observed for each phase of the embryonic development of the species studied.

DISCUSSION

The initial increase in volume and weight of the eggs due to water absorption may be considered the rule among harvestmen, as described for several species (Henking 1886, Immel 1955, Juberthie 1964, 1965, and see also Gnaspini 2007), although it seemed less evident in *I. pustulosa* and *A. leucopheus*.

We should stress that no cumulus could be observed on the developing embryos, as observed in other harvestmen (with one exception, an Eupnoi – Yoshikura 1975), and differing from other known arachnids such as the well-studied spiders (although a cumulus also does not appear in some spiders) (e.g., Muñoz-Cuevas 1971, Yoshikura 1975, Foelix 1982, Gilbert 1997). The sinking of the yolk granules and formation of a perivitelline space, as well as the appearance of a blastocoel, as can be seen in spiders (e.g., Yoshikura 1975, Foelix 1982) also does not occur in harvestmen (as discussed by Yoshikura 1975).

Comparing the two studied species between themselves and with data from *P. quinamavidensis* (Juberthie & Muñoz-Cuevas 1971, Muñoz-Cuevas 1971, 1973), the only tropical laniatorean studied so far (also a gonyleptid, from a different subfamily), we may conclude that the general morphology patterns are preserved, when considering the formation of tissues and organs. However, the pigmentation starts much later in the two species studied herein, in the middle of phase V, whereas it starts at the beginning of phase IV in *P. quinamavidensis*. In addition, although starting at the same rate and degree in the two studied species, pigmentation accelerates and reaches a more accentuated degree in *I. pustulosa*. Anyway, larvae of both species hatch (and conserve this pattern in the next few molts) with a typical “shades of gray” color pattern, which probably aims at the concealment of the young. Adults of *A. leucopheus* are pale yellow (Fig. 1), preserving the general light color pattern of the young; but adults of *I. pustulosa* achieve a green background color with many round white spots and a few black spots (represented mainly by spines) (Fig. 2), a typical patchy coloration camouflage probably due to their “diurnal” habits (see Hoenen & Gnaspini 1999, Gnaspini & Hara 2007), which is lighter and differs from the early juvenile color patterns.

In addition to the features cited by Muñoz-Cuevas (1971) to recognize the embryonic phases, we may include the development of external dorsal features. Although it was not clearly stated by Muñoz-Cuevas (1971) and Juberthie (1964), it could be noticed by their drawings and it was clear in our pictures and SEM and histological analysis that, in addition to considering the embryonic development to be superficial, we may state that it begins with the ventral features. First, in phase II, germ cells appear as a ventral band (as in Fig. 34), afterwards growing laterally towards the dorsum, involving the yolk mass (as in Figs. 35-36). Then, during phases III and IV, the appendages (and also the lobes of the labium and the epistome) develop on the ventral surface (e.g., Figs. 48, 61, 64), whereas the dorsal portion of the embryo is filled with

yolk, and the dorsal surface of the embryo is still represented by the “original” dorsal surface of the egg (see Figs. 48, 64). Actually, although the term “inversion” (phase IV) is used for harvestmen, the characteristic “migration” of the lateral halves of the germ band towards the dorsal region fusing dorsally at the end of inversion, which is typical of spiders (e.g., Yoshikura 1975, Foelix 1982), does not happen in harvestmen, as could be seen here and was already commented by Yoshikura (1975). Also the long germ band typical of spider embryos in phase III (e.g., Yoshikura 1975, Foelix 1982), in which the tail and the cephalic plates almost reach each other and in which several abdominal segments can be recognized, is not present in the studied harvestmen; and a typical cephalic plate cannot either be recognized.

Moreover, there are differences among harvestmen. In Eupnoi harvestmen, although the limb buds pass from a convex distribution to a “flat” (almost straight) disposition during the process of inversion (due to the flattening of the ventral region of the embryo), this lateral migration (apart from the midline) is less pronounced than in spiders. Meanwhile, the furrows that define the segments of the abdomen grow laterally towards the dorsum, meeting dorsally (while the segments of the abdomen also grow in number, from three to eight, as observed by Holm 1947, among others). In two more days, the (dorsal) embryonic cuticle is formed, when a ninth segment appears (as observed by Holm 1947). In turn, in the studied laniatoreans, not only the difference between the starting convex disposition to an almost straight disposition of the bases of the limb buds is less pronounced than in Eupnoi, but also the distance between opposite limb buds in relation to the midline is practically the same during inversion (for instance, as in Figs. 19-22), since the limb buds are formed at the sides of the parallel ridges that first appear in the embryo, far from the midline.

It is only after the formation of the dorsal cuticle (what we may define as the beginning of phase V) that internal features (such as the digestive ceca and the cardiac tube) appear, and also that external dorsal features (such as eyes and integument characters) appear. Moreover, although the eyes can be recognized by transparence in the photographs of the species studied herein, they are represented in the dorsal surface of the embryo by slight differences in the integument, and by the presence of perforations (see Fig. 56). These perforations occur in three groups along each lateral margin of the embryo (see Fig. 55), and we are not aware of their function.

Yet, it is only at the middle of phase V that abdominal segments can be recognized in the presently studied species (see Figs. 51-52, and compare to Fig. 47). In lateral view, we can recognize transverse furrows (Fig. 52, arrows) limiting the abdominal segments, although these furrows (as well as the segments) are barely recognized in frontal view (Fig. 51, arrows). The number of segments differs from that recorded in Eupnoi (e.g., Holm 1947, as above, Moritz 1957, Winkler 1957, Juberthie 1964). We should stress that harvestmen have a compact shape, with a fusion between cephalothorax and abdomen, resulting in different patterns of dorsal

sclerotization (see, e.g., Schultz and Pinto-da-Rocha, 2007). The pattern typical of laniatorean harvestmen is termed "*Scutum magnum*", which results from the fusion between the prosoma and the first five opisthosomal tergites, leaving only a few "free" segments at the end of the body (which are the ones recognized in Figs. 51-52), generally termed "free tergites" [and "free sternites"] and the anal plate. Holm (1947), Moritz (1957) and Winkler (1957), for instance, recognized 10 opisthosomal segments in the studied embryos of Eupnoi harvestmen, in which another typical pattern ("*Scutum parvum*"), with a less pronounced fusion (but still presenting it) between the first five opisthosomal tergites, can be recognized. Anyhow, in this case, the opisthosomal somites are still free in the embryo, whereas they seem to be already fused in the presently studied laniatoreans (and probably all other laniatoreans). Moreover, the timing also differs between these groups. In Eupnoi, the presence of the first three abdominal segments is recognized early in development (immediately after the formation of the six somites which will bear the appendages) (e.g., Holm 1947, Moritz 1957, Winkler 1957, Juberthie 1964), whereas they can be recognized in the studied laniatoreans (both from present data and from the drawings from Muñoz-Cuevas 1971) only when the digestive ceca begin to appear. The Dyspnoi studied (e.g., Avram 1973) follow the same patterns described for the Eupnoi.

During embryogenesis, first the integument appears densely folded (e.g., Fig. 57), and the future setae already appear as long smooth conical projections from the surface, with no sign of articulations, and some details of the integument (such as microtrichia) already appear in some legs, and the tarsal claws are already present as well (e.g., Fig. 40); afterwards, the future setae elongate and their base is pronounced; and more details of the integument appear as well, as it becomes "stretched" (for instance, allowing the better viewing of the microtrichia) (e.g., Figs. 58, 69, 70). In addition, although the proportion among the size of the articles of the appendages changes with time, their number and general shape appear at the very beginning of phase IV (as can be seen in the chelicerae – e.g., Figs. 67-70). This is other difference with Eupnoi, in which the legs show the first traces of dividing into joints only when they start to grow fast, which happens when the eighth abdominal segment appears and the opisthosomal segments reach the dorsal side (Holm 1947).

Another important difference occurs in the disposition of appendages around the embryo. In Eupnoi (e.g., Holm 1947, Juberthie 1964), the legs grow downwards. Legs I and II grow transversely to the body axis, crossing each other under the embryo and growing upwards at the other side of the embryo; and the apex of legs II meet dorsally. Legs III and IV bend forward under the embryo (passing over legs I and II), and grow upwards at the sides of the chelicerae (which take a position parallel to each other); and legs IV may even surpass the line of the eyes and reach the dorsum. The Dyspnoi studied (e.g., Avram 1973) show the same pattern, although their legs are shorter, so that only the apex of legs II can be seen from a dorsal view, on the sides of the embryo; and legs III and IV pass over the distal portion of the

chelicerae. In Laniatores (both from our data [e.g., Figs. 50, 52, 61, 64] and from the drawings from Muñoz-Cuevas 1971, although not explicitly stated by that author), legs I and II, and legs III and IV, take the same general positions as in Eupnoi (the first two grow transversally to the body axis, and the latter two bend forward, passing over the first two). However, the legs grow in a bent position: the femur is placed laterally upward, and the patella is flexed so that tibia+metatarsus+tarsus grow downward. Because of that, the lateral face of the embryo is covered by the growing legs, and the apex of the legs only reach the ventral face of the embryo (they do not extend towards the opposite side, in the case of legs I and II, or over the frontal region, in the case of legs III and IV). In addition, in Laniatores, although the first article of the chelicerae are parallel to each other, the second articles bend laterally apart from each other, so that the chelicerae take an upside-down Y shape in front view (e.g., Fig. 61). Probably because of that, instead of running parallel at the sides of the chelicerae, legs III and IV run close to each other straight forward, in between the second segments of the chelicerae, almost reaching the mouth.

Since no molt occurs during embryogenesis inside the egg, we would expect that the exoskeleton is not formed until the larval phase (L) is reached. Indeed, after emerging from the eggshell, not only is the exoskeleton of the larva completed, but also its “second”, internal exoskeleton, which represents the skin of the pharate first nymph, which can be seen in Fig. 71. This was also previously recorded by Winkler (1957). However, our study showed that, unexpectedly, the formation of the first nymph exoskeleton (and, consequently, the pharate state) occurs early in development, still in phase V (as can be seen in Fig. 60). In other words, while the internal organs are beginning to develop, not only the appendages are fully developed but also their exoskeleton has already reached a very advanced stage.

Also unexpectedly, we detected one egg tooth in *I. pustulosa*. Contrary to those recorded in Eupnoi and Dyspnoi, which are very dark, the one detected in *I. pustulosa* has the same color as the surrounding integument and can not be clearly identified through the transparent eggshell (as in Fig. 28, for instance); it could only be clearly detected with the SEM micrographs (as in Figs. 64, 71, 72). Whether this projection works as an egg tooth or not remains to be studied. Although Muñoz-Cuevas (1971) suggested that the chelicerae may be involved in hatching, since he did not detect an egg tooth, we believe this is unlikely due to the “parallel” position of the chelicerae in relation to the eggshell. Moreover, maybe he has not detected an egg tooth because of the technique he used in his study, since we could not recognize it either by simply looking through the transparent chorion. However, since we also detected a “primordium” of egg tooth in the other studied laniatorean (although in this species, this projection does not take an upright position in the late embryo, and, therefore, is probably not involved in hatching), it may indicate that this may be a residual trait during the development

of the clypeus, and may turn into an egg tooth (as in *I. pustulosa*) or not (as in *A. leucopheus*). This deserves future investigation, especially among other laniatoreans.

After hatching, larvae have a leg with bent femora and tibia (either as a consequence or a need related to the concealment inside a round egg shell), which become longer and straight after the first molt (to first nymph stage) - Juberthie (1964) noted this rapid growth between larva and first nymph in Phalangiidae, Sclerosomatidae, and Ischyropsalididae as a whole, and called it a “larval step”. This rapid growth between larvae and first nymph, as well as between first and second nymphs, seems to be typical of harvestmen with long legs (see Gnaspini 1995, 2007).

Duration data from *P. quinamavidensis* (Juberthie & Muñoz-Cuevas 1971, Muñoz-Cuevas 1971, 1973) were added to Table 1. For this species, minimum and maximum values for duration are related to the upper and lower lethal temperature values for embryo development (20 °C and 12 °C, respectively), whereas data from the species studied herein concern minimum and maximum values observed in the field. Probably because of that, the ranges observed for *P. quinamavidensis* are generally larger than those observed in the species presently studied. Even considering this difference, general comparisons may be made, and show that the total duration is similar among the three species, being slightly shorter in *A. leucopheus*. The total duration also conforms to that observed in other groups of harvestmen (see Gnaspini 2007: Table 1). When each phase is observed individually, phase I+II and the larval phase are much shorter in the species studied here than in *P. quinamavidensis* (even considering optimal values), whereas phases III to V are shorter in this species (see Table 1). We should stress that the increase (or decrease, depending on what phase is being compared) in length always follows the sequence *A. leucopheus* - *I. pustulosa* - *P. quinamavidensis*; in other words, *I. pustulosa* is always intermediate between the other two.

Especially when the species studied herein are observed, we should also comment that the minimum range of the total duration observed for the embryos in the field is the same as the total duration obtained by summing the individual values of each phase, whereas the maximum value observed directly for the total duration is much smaller than summing the maximum individual values. This probably indicates that, for each individual, only one or two phases may reach long duration values, whereas the other have the “normal fast” duration; otherwise, if some given eggs are slower (as a whole) than the other ones, we would expect to find some eggs in the field with total duration similar (or at least closer) to the maximum values obtained when phase durations are summed to each other, and this was not observed. Yet, this may also indicate that the minimum (or close) values observed individually for each phase are probably the values practiced for most individuals in the field, since the maximum TED (total embryonic development, see Table 1) considering the whole embryonic duration in the field is only slightly longer than the minimum TED observed in the same way, but much shorter than the maximum TED resulting from summing the maximum values of each phase.

Anyway, we may conclude that, although we started to shed some additional light on the understanding of harvestmen embryology under an evolutionary perspective, by studying a large but neglected group within harvestmen, after a gap of more than 30 years, and by detecting information mostly different from those previously known from other species, there is a long way to go, but, at least, we identified some steps to follow.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was conducted with financial support from CNPq # 142253/2005-7 to CFL and FAPESP # 00/04686-4 and CNPq # 300326/94-7 and 301839/04-2 to PG.

LITERATURE CITED

- Avram S. 1973. Contribution à la connaissance du développement embryonnaire et postembryonnaire chez *Nemastoma* cf. *sillii* Herrman (Opiliones, Nemastomatidae). In: Orghidan T, editor. Livre de cinquantenaire de l'Institut de Spéologie "Émile Racovitza". Academia Republicii Socialiste Romania, Bucuresti. p. 269-303.
- Foelix RF. 1982. Biology of spiders. Harvard University Press, Cambridge.
- Gilbert SF. 1997. Arthropods: the crustaceans, spiders, and myriapods. In: Gilbert SF, Raunio AM, editors. Embryology: Constructing the organism. Sinauer Associates, Sunderland. p. 237-257.
- Giribet G, Kury AB. 2007. Phylogeny and biogeography. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 62-87.
- Gnaspini P. 1996. Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). J Zool 239:417-435.
- Gnaspini P. 2007. Development. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 455-472.
- Gnaspini P, Hara MR. 2007. Defense mechanisms. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 374-399.
- Hara MR, Gnaspini P, Machado G. 2003. Male egg guarding behavior in the neotropical harvestman *Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922) (Opiliones, Gonyleptidae). J Arachnol 31:441-444.
- Henking H. 1886. Untersuchungen über die Entwicklung der Phalangiden. Part I. Z wissenschaft Zool 45:86-175.
- Hoenen S & Gnaspini P. 1999. Activity rhythms and behavioral characterization of epigean and cavernicolous harvestmen (Arachnida: Opiliones). J Arachnol 27:159-164.
- Holm A. 1947. On the development of *Opilio parietinus* Deg. Zool Bid Uppsala 25:409-422.
- Immel V. 1954. Zur Biologie und Physiologie von *Nemastoma quadripunctatum* (Opiliones, Dyspnoi). Zool Jahrb Abt Syst Ökol Geogr Tiere 83:129-184.
- Immel V. 1955. Einige Bemerkungen zur Biologie von *Platybunus bucephalus* (Opiliones, Eupnoi). Zool Jahrb Abt Syst Ökol Geogr Tiere 83:475-484.
- Juberthie C. 1960. Action de différentes températures constantes sur le développement des oeufs de l'Opilion *Odiellus gallicus* E. S. C R Séanc Acad Sci 250:2079-2081.
- Juberthie C. 1964. Recherches sur la biologie des opilions. Ann Spéleol 19:5-238.
- Juberthie C. 1965. Données sur l'écologie, le développement et la reproduction des Opilions. Rev Écol Biol Sol 2:377-396.
- Juberthie C, Muñoz-Cuevas A. 1971. Sur la ponte de *Pachylus quinamavidensis* (Opilion, Gonyleptidae). Bull Soc Hist Nat Toulouse 107:468-474.

- Machado G, Pinto-da-Rocha R, Giribet G. 2007. What are harvestmen? In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 1-13.
- Moritz M. 1957. Zur embryonalentwicklung der Phalangiiden (Opiliones, Palpatores) unter besonderer Berücksichtigung der äusseren Morphologie, der Bildung des Mitteldarmes und der Genitalanlage. Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere 76:331-370.
- Moritz M. 1959. Zur embryonalentwicklung der Phalangiiden (Opiliones; Palpatores). II. Die Anlage und Entwicklung der Coxaldrüse bei *Phalangium opilio* L. Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere 77:229-240.
- Muñoz-Cuevas A. 1971. Étude du développement embryonnaire chez *Pachylus quinamavidensis* (Arachnida, Opiliones, Laniatores). Bull Mus Natl Hist Nat (2) 42:1238-1250.
- Muñoz-Cuevas A. 1973. Embryogenèse, organogenèse et rôle des organes ventraux et neuraux de *Pachylus quinamavidensis* Muñoz (Arachnides, Opilions, Gonyleptidae). Comparaison avec les Annélides et d'autres Arthropodes. Bull Mus Natl Hist Nat (3) 196:1517-1537.
- Pabst W. 1953. Zur biologie der mitteleuropäischen Troguliden. Zool Jahrb Abt Syst Ökol Geogr Tiere 82:1-46.
- Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. 2007. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge.
- Purcell WF. 1892. Über den Bau und die Entwicklung der Phalangiden-Augen. Zool Anz 15:461-465.
- Shultz J, Pinto-da-Rocha R. 2007. Morphology and functional anatomy. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 14-61.
- Winkler D. 1957. Die Entwicklung der äusseren Körpergestalt bei den Phalangiidae (Opiliones). Mitt Zool Mus Berlin 33:355-389.
- Yoshikura M. 1975. Comparative embryology and phylogeny of Arachnida. Kumamoto J Sci, Biol 12:71-142.

TABLE 1. Duration (in days) of each phase of the embryonic development of three gonyleptid harvestmen: *Ampheres leucopheus* (Caelopyginae), *Iporangaia pustulosa* (Progonyleptoidellinae), and *Pachylus quinamavidensis* (Pachylinae – data taken from Muñoz-Cuevas 1971). Abbreviations: I+II = phases I and II (cleavage and germ band formation, III = phase III (metamerization of the prosoma), IV = phase IV (inversion), V = phase V (larval organogenesis), L = larval phase, and TED = total embryonic development (from egg laying to egg hatching) - TED1 is obtained summing the values observed in each phase, and TED2 is taken from observations from the field considering the whole embryonic duration. For comparison reasons, we also added (between parentheses) the percentile duration relatively to TED1.

Species	I+II	III	IV	V	L	TED1	TED2
<i>A. leucopheus</i>	4 - 9	3 - 7	11 - 19	9 - 17	2 - 4	29 - 56	29 - 37
	(13.8-16.1%)	(10.3-12.5%)	(33.9-37.9%)	(30.4-31.0%)	(6.9-7.1%)		
<i>I. pustulosa</i>	6 - 12	4 - 8	12 - 21	10 - 19	3 - 6	35 - 66	35 - 40
	(17.1-18.2%)	(11.4-12.1%)	(31.8-34.3%)	(28.6-28.8%)	(8.6-9.1%)		
<i>P. quinamavidensis</i>	10 - 20	3 - 5	8 - 13	7 - 20	7 - 18	35 - 76	37 - 70
	(26.3-28.6%)	(6.6-8.6%)	(17.1-22.9%)	(20.0-26.3%)	(20.0-23.7%)		

Figure captions

Figs. 1-5. (1) A male *A. leucopheus* taking care of eggs; (2) a male *I. pustulosa*; (3) an egg batch of *I. pustulosa* involved in a thick layer of mucus; (4-5) part of an egg batch of *A. leucopheus* and *I. pustulosa*, respectively, showing recently laid eggs on the left and an egg on a more advanced phase on the right.

Figs. 6-17. Embryological development of *A. leucopheus*. (6) phase III (prosoma metamerization), showing the appearance of the parallel ridges on the two opposite sides of the embryo; (7-11) progressive modifications during phase IV (inversion phase): appearance and growth of appendages, appearance of the cardiac tube dividing the body into two lateral lobes, appearance of the abdominal somites (in the form of two to four bulges); (12-17) progressive modifications during phase V (larval organogenesis), showing appearance of the digestive ceca, appearance and development of eye pigmentation and of body pigmentation. The same scale for all figures.

Figs. 18-29. Embryological development of *I. pustulosa*, following the same scheme as in Figs 6-17: (18) phase III; (19-23) phase IV; (24-29) phase V. The same scale for all figures.

Figs. 30-36. (30-31) Larval phase (phase L) of *A. leucopheus* and *I. pustulosa*, respectively, showing the final pigmentation pattern of the embryos; (32-33) Hatched larvae (walking over eggs with different stages of development) of *A. leucopheus* and *I. pustulosa*, respectively, showing typical legs with curved femora and tibiae; (34) section of an recently laid egg of *I. pustulosa*, showing inside completely filled with yolk, in red (phase I); (35) section of an embryo of *A. leucopheus* in intermediate phase II, showing the mass of yolk (in red) involved ventrally by a layer of cells (in purple – dotted outline); (36) section of an embryo of *I. pustulosa* in advanced phase II, showing the mass of yolk (in red) involved ventrally and laterally by a layer of cells (in purple – dotted outline).

Figs. 37-42. *A. leucopheus*. (37) egg; (38) detail of egg showing granules of yolk; (39) beginning of phase IV, showing embryo inside eggshell; (40-42) detail showing apex of chelicera at the beginning of phase IV, at an intermediate phase IV, and at phase V, respectively – notice difference in the development of integument and especially of setae.

Figs. 43-48. *A. leucopheus*, intermediate phase IV, in views: anterior, ventral, posterior, left, dorsal, anterior (legs open).

Figs. 49-54. *A. leucopheus*, phase V, in views: anterior, ventral, posterior, left, dorsal, right. Inset of Fig. 53 shows what may be an egg tooth ("et") in detail.

Figs. 55-60. *A. leucopheus*. (55-56), anterior-lateral region, showing perforations on the dorsal integument (55 = phase IV, 56 = phase V, detail on top of eyes); (57-58) dorsal-posterior (57 = phase IV, 58 = phase V) and posterior (59, phase IV, but it has the same pattern in phase V)

integument showing microtrichia and pointed plates; (60) leg III of phase V showing leg of pharate first nymph inside.

Figs. 61-66. *I. pustulosa*, phase IV. (61-65) views: anterior, posterior (detail), left, dorsal, left-anterior; (66) apex of leg III, showing single tarsal claw and microtrichia. Inset of Fig. 64 shows egg tooth ("et") in detail.

Figs. 67-72. *I. pustulosa*. (67-70) general view of chelicera and detail of setae close to movable finger (67-68 = phase IV, 69-70 = phase V); (71) larva, anterior view – notice pharate first nymph inside; (72) anterior-dorsal view showing impression of eye (dotted outline) with perforated integument (arrows).

ANEXO 2

Embryonic development in Goniosomatinae harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae) from Brazil

ABSTRACT. The first studies concerning the embryonic development of harvestmen started in the late XIX century, mostly focusing on holarctic species, and the last studies appeared during the late 1970s. Recently, aiming at filling a gap of more than 30 years in the study of embryology of harvestmen, we described the embryonic development of two gonyleptids with paternal care. The present study includes the complete description of the embryonic development of two species of harvestman belonging to the Goniosomatinae subfamily (Laniatores Gonyleptidae), *Goniosoma proximum* and *Goniosoma spelaeum*, and also additional sparse data from a third, undescribed species. These species present maternal care of egg batches. Eggs of both species are laid with ca. 1.5 – 1.6 mm in diameter, reaching ca. 2.1 mm in *G. proximum* and 2.3 mm in *G. spelaeum* near hatching. The duration of the embryonic phase inside the eggshell was 31–48 days in *G. proximum*, 29–54 days in *G. spelaeum*, and 21–27 days in the undescribed goniosomatine. When compared to previously described laniatoreans, gonyleptids of the subfamilies Pachylinae (with maternal care) and Caelopyginae and Progonyleptoidellinae (both with paternal care), timing of development was similar, but the sequence of patterns was different, especially from the latter ones.

KEY WORDS: *egg size; embryology; duration of embryonic phase; harvestmen; germinal band*

INTRODUCTION

Harvestmen are arachnids characterized by having the prosoma partially fused to the opistosoma, a pair of exocrine glands opening at the sides of the body, and the presence of a penis and an ovipositor, respectively, in males and females, for direct sperm transfer and egg laying. Presently, four suborders are recognized: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi and Laniatores, being the latter the largest (about 3800 out of 6000 species presently recognized in the Order) and represented mostly by tropical species, mainly in the Neotropics (e.g., Machado et al 2007, Shultz & Pinto-da-Rocha 2007, Giribet & Kury 2007). Most studies concerning harvestman focused on holarctic species, but the number of studies concerning the reproductive biology and development of Neotropical laniatoreans have increased in the last two decades and led to important discoveries and some reinterpretation of the previous knowledge about the group. A concise summary about harvestmen has been recently published (see Pinto-da-Rocha et al 2007).

The study of the embryonic development of harvestmen started in the late XIX century, and reached its maximum between the 1950s and middle 1970s (see Gnaspini 2007 for a comprehensive review). As expected at that time, the great majority of studies dealt with temperate holarctic species, mostly of Eupnoi and, on a smaller scale, Dyspnoi. The only laniatorean exceptions were the European *Scotolemon lespesi* Lucas 1860 and *Holoscotolemon querilhaci* (Lucas 1864), both briefly studied by Juberthie (1964), and *Pachylus quinamavidensis* Muñoz-Cuevas 1969 (Gonyleptidae Pachylinae), a Chilean species with maternal care and the behavior of covering eggs with debris (Juberthie & Muñoz-Cuevas 1971), studied by Muñoz-Cuevas (1971) in the laboratory in France. No study was published afterwards until very recently, when we (**anexo1) focused on the embryology of the gonyleptids *Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922) (Caelopyginae) and *Iporangaia pustulosa* Mello-Leitão 1935 (Progonyleptoidellinae), two species with paternal care.

The recent papers adopted the phases of embryonic development established by Juberthie (1964) and Muñoz-Cuevas (1971), and we (**anexo1) slightly modified the boundaries of the phases by establishing specific morphological features used to define the start of each phase. In that scheme, five distinct phases were identified during the embryonic development: cleavage (phase I), germ band formation (II), metamerization of the prosoma (III), inversion (IV) and larval organogenesis (V). According to Holm (1947, and references therein), the cleavage in harvestmen is superficial, and early in the embryonic development a continuous layer of flat cells with small nuclei is present, as well as deeper situated and larger nuclei; then a spot appear in the blastoderm, representing an early genital rudiment, after what the formation of the germ band can be observed. The metamerization of the prosoma starts when parallel ridges are first seen over the embryo, and is characterized by the condensation of cellular material on the ventral side of the yolk mass, followed by the early development of the appendages primordia and the organization of the cephalic and anal plates, with the segmentation of the embryo in six somites (Juberthie 1964, Muñoz-Cuevas 1971, **anexo1). The inversion phase starts when the projections which will develop into appendages appear and it is marked by the appearance of the abdominal somites, together with the formation of the ocularium (= eye mound), the oral orifice and the claws, with the chelicerae approaching the medium-anterior plane and the full development of the appendages, as well as the beginning of the pigmentation process (Muñoz-Cuevas 1971, **anexo1). The larval organogenesis phase starts with the beginning of the formation of the digestive ceca and also includes the development of the digestive cecum and the differentiation of the eyes and the heart, with further pigmentation of the embryo and, when present, the formation of the hatching tooth (or teeth, when paired) (Immel 1955, Muñoz-Cuevas 1971, **anexo1). The first heartbeat was considered the starting point of the larval phase (phase L), still inside the egg, but we (**anexo1) considered that phase L starts when pigmentation pattern is completed. In this

phase the embryo is prepared for hatching. After hatching, the larva takes a long (in Cyphophthalmi) or short time (in the other suborders) to molt into the first nymph stage.

Concerning reproductive biology, the well studied Eupnoi have long ovipositors and hide their eggs inside a substrate (in burrows, in hollows, between the bases of leaves, etc.), whereas the Laniatores have short ovipositor and lay their eggs on the surface of substrates and may cover them with debris or stay near them during all embryonic phase (see Machado & Macías-Ordóñez 2007 for a review). Cases of parental care have been observed in several species of Gonyleptidae, apparently having evolved several times within the family (Machado & Raimundo 2001; Willemart & Gnaspini 2004), and paternal care has been observed in two closely related subfamilies, Caelopyginae and Progonyleptoidellinae (Hara et al. 2003; Machado et al. 2004). In species with paternal care, males guard oviposition sites and copulate with successive females, which deposit their eggs immediately after copulation and leave the site. Thus, batches of these species are usually originated by several females and present eggs in different developmental stages, since they are laid in separate events (Hara et al. 2003; Machado et al. 2004). In turn, egg batches guarded by females are laid by a single female and may be the result of a single or multiple copulation events (see, e.g., Gnaspini 1996, Machado & Oliveira 1998).

Considering the need for the study of harvestmen embryology and the fact that the few laniatorean harvestmen previously studied presented either egg covering behavior (with debris) or paternal care, in the present paper we focused on the embryology of Neotropical species of the subfamily Goniosomatinae, which show maternal care, on a comparative basis.

MATERIALS AND METHODS

The present study focused on two Neotropical species of goniosomatine harvestmen (family Gonyleptidae) with maternal care, *Goniosoma proximum* (Mello-Leitão 1922) (Fig. 1) and *Goniosoma spelaeum* (Mello-Leitão 1933) (Fig. 2). Females of the first species generally lay eggs on the underside of leaves, whereas the second lives inside caves and lays eggs on the walls and ceilings. The study was conducted in the field at Intervalles State Park, an Atlantic Rain Forest reservation in southern São Paulo state, Brazil (see Gnaspini 1996). Additional data were taken from an undescribed species that inhabits the tunnels of the Guaricana Dam, in Paraná state – some eggs were obtained in the laboratory and partially studied.

Two field trips were conducted in consecutive years (2006 and 2007), from January to March, since previous observations showed that there is a reproductive peak of these species during the warm and humid season (summer) (see Gnaspini 1995). Respectively, 10 and nine egg batches of *G. proximum* and *G. spelaeum* were selected, allowing the observation of more than 200 individual eggs per species.

To document the embryonic development, from egg laying to hatching, 20-30 photographs were taken daily directly from each egg batch, in different positions and angles, using a Nikon D100 Digital Camera (6.1 Mpix) coupled to a 105 mm Macro lens with two intermediate rings, aiming at a large magnification. In addition, some eggs in different embryonic phases were collected in 70% ethanol and taken to the laboratory for analysis under SEM. Since the embryos were protected inside the eggshell, no previous cleaning treatment was performed. The material was dehydrated in a series of 70-80-90% ethanol, for 15 minutes in each concentration, and in three sessions of 10 minutes each in 100% ethanol, afterwards being taken to the "Critical Point Dryer BAL-TEC CPD 030". Afterwards, the material was mounted on a stub and taken to gold coating in the "Sputter Coater Balzer SCD 50". The material was then examined under the ZEISS DSM 940 SEM of the Electronic Microscopic Laboratory of IBUSP. Yet, for the recognition of first phases, we used traditional H-E histological techniques.

The following codes are used in figures (see descriptions in the text): ch = chelicera; cp = cephalic plate; dc = digestive ceca; ep = epistome; et = egg tooth; ht = heart tube; l1-l4 = leg I to leg IV; mo = mouth; pd = pedipalp. For the photographs, we indicate the range in days in which that given pattern could be recognized in the field.

RESULTS

Egg batches are laid in one main deposition event in both species, although some eggs (1–4 %) may be added afterwards, sometimes some days later, leading for the occasional presence of eggs in different stages in the batches. Egg batches (N = 5) of *G. proximum* (Fig. 1) comprised 154 ± 28 eggs when laid, 161 ± 26 eggs after five to nine days, and 146 ± 28 just before the first hatching, whereas the numbers (N = 5) for *G. spelaeum* (Fig. 2) were respectively 113 ± 28 eggs, 114 ± 28 eggs, and 111 ± 30 eggs.

Eggs of *G. proximum* and *G. spelaeum* are laid with an average of 1.55 ± 0.13 mm and 1.57 ± 0.10 mm in diameter (N = 10), respectively. These values represent a relative size of ~15-20% in relation to the length of the dorsal scute of the females of both species. There is a rapid initial increase in volume (and weight) of the eggs, probably due to water absorption, with only a slight additional growth occurring during embryogenesis. Close to hatching, eggs measured 2.16 ± 0.07 mm and 2.35 ± 0.09 mm in diameter (N = 10), in *G. proximum* and *G. spelaeum* respectively, now representing around 25% of the length of the dorsal scute of females. Egg growth during embryogenesis corresponds to a 90-120% increase in volume in these species. Additionally, we dissected an ovigeran female of *G. spelaeum*, inside of which we detected 94 eggs, which measured 1.34 ± 0.16 mm (N = 10). Therefore, there is also an increase in size during oviposition.

The main morphological changes during embryology follow the same pattern recently described by us (***anexo1). Therefore, here we shall highlight the main differences detected in the studied goniosomatines. The eggshell in both species is completely transparent, aiding the detailed observation of the embryonic development.

Eggs of *G. proximum* (Fig. 37) and *G. spelaeum* are pale brown when laid, due to the brownish color of the yolk (darker in the first species). Because of that, the first changes during cleavage could be observed, as they appear as white spots against the brownish yolk (Figs. 3-4, 6-7). According to Holm (1947) the small white spots (as in Figs. 3 and 6) seen on the surface of the egg, which he observed in an around 5h late embryo, are due to plasmatic portions around deeper situated nuclei; and around 24h in his observations, large white spots are seen as the blastoderm is formed (as in Figs. 4 and 7). The Germ Band Formation stage (phase II) that follows could not be clearly detected in the presently studied species.

The prossoma metamerization stage (phase III) starts with the simultaneous appearance of a series of six whitish parallel ridges on the two opposite sides of the embryo (Figs. 5 and 8). Next, at the very beginning of the inversion stage (phase IV), these ridges become shorter and wider as six pairs of appendage buds appear (Fig. 21). During phase IV (Figs. 9-13, 21-25), the appendages grow continuously towards the posterior ending (as in Figs. 11 and 13), and their tips bend slightly inward (as in Fig. 10). At this time, the articulated nature of the appendages is already noticeable (see Figs. 11 and 24), and the body of the embryo is reduced in volume, being restricted to less than half the volume of the egg (the animal pole). At the beginning of phase IV, the cephalic plates ("cp" in Fig. 10) and the mouth ("mo" in Fig. 22) already appear, as well as the rudiment of the epistome, which appears as a small anterior projection ("ep" in Figs. 22-23) that will further develop and move downward while the chelicerae move forward to meet together on the frontal region ("ch" in Fig. 12). Later, a barely visible white longitudinal line across the embryo marks the appearance of the heart ("ht" in Figs. 12 and 25), forming a longitudinal dorsal tube that divides the body of the embryos in two lobes.

The formation of two or three transversal ridges in the lateral lobes corresponds to the initial formation of the digestive ceca ("dc" in Figs. 14 and 26), and marks the beginning of the larval organogenesis phase (phase V) (Figs. 14-20, 26-32). The digestive ceca develop further during this phase. Due to the typical brownish color of the yolk, it can be seen that the yolk is fully involved by the developing digestive ceca. Meanwhile, the anterior region of the embryo further differentiates, with the eyes appearing and being progressively pigmented ("ey" in Figs. 16-20 and 27-32). At this point, the appendages reach full development and assume a characteristic disposition. The first articles of the chelicerae are parallel to each other, but the second articles bend laterally apart from each other, so that the chelicerae takes an upside-down Y shape in front view (e.g., Figs. 19 and 32). Legs I and II grow transversally to the body axis, and their tips meet ventrally; whereas legs III and IV bend forward, passing over the first

two as they run close to each other straight forward, in between the second segments of the chelicerae, almost reaching the mouth (as in Figs. 15 and 19; see also Fig. 36). In addition, the legs grow in a bent position: the femur is placed laterally upward, and the patella is flexed so that tibia+metatarsus+tarsus grow downward (e.g., Fig. 31).

The body pigmentation process starts after the eye pigmentation process (Figs. 16-17, 27-28). First, the dorsal area of the prosoma (the region surrounding the eyes) and the appendages present pigmentation, and, as they darken, other regions of the body become pigmented. Slight differences occur in the two studied goniosomatines. The pigmentation of the appendages of *G. proximum* starts with an orange color, which is gradually substituted by a purplish gray, which will, at the end of the process, provide a “shades of gray” pattern to the embryo. In turn, although light orange spots can be seen on the appendages in *G. spelaeum*, the main pigment observed is purplish gray, even if very light in tone at the beginning. When the pigmentation is completed (marking the beginning of the larval phase - phase L), the embryo of *G. spelaeum* is a little lighter in shade (with a somewhat “washed” coloration) than that of *G. proximum* (Figs. 33, 35-36). Although not ringed, femora and tibiae seem multiarticulated because of their stripped color pattern (as in Figs. 20 and 31). In both species, after hatching, the larvae have bent femora and tibiae (see, e.g., Gnaspini 2007: Fig. 13.1D) and molt to the first nymphal stage (Fig. 34) in ca. 20 minutes. Duration of each developmental stage and of the whole embryonic phase is shown in Table 1.

DISCUSSION

The general embryological patterns observed in other harvestmen, especially among laniatoreans (see Gnaspini 2007, ***anexo1), were observed in the species studied herein, with some differences that deserve to be commented.

The typical initial increase in egg volume and weight during embryogenesis (e.g., Gnaspini 2007) was also detected, but this increase is larger in goniosomatines (90-120%) than in other gonyleptids (around 40-50% - see ***anexo1). We have two possible explanations which should be tested as more harvestmen are studied. First, this may be related to the number of eggs in the batches and the consequent size of eggs. Progonyleptoidellines and caelopygines have paternal care and the egg batches are provided by different females (e.g., Hara et al 2003, ***anexo1), and each female may lay 80-100 eggs, whereas goniosomatine females may lay 150-200 eggs. Therefore, since the energy investment of females may not be too diverse, eggs are smaller in the second group. However, in order to lead to a viable animal, the final size of the embryo should be comparable, demanding a larger growth during embryogenesis in the second group. Nevertheless, the smaller growth amongst the goniosomatine was observed in the species which laid a larger number of eggs (*G. proximum*),

which may also be related to energy limitations. Second, since the studied goniosomatines have long legs, maybe a larger space is needed inside the eggshell (leading to a larger overall volume of the egg) in order to accommodate the larger volume represented by the legs. However, concerning the disposition of the legs and their size relatively to the body (compare, e.g., Figs. 33 and 36 to ***anexo1) not much difference can be noted. Yet, we would expect that egg growth occurred when legs start to develop, but the increase in egg size occurs at the beginning of embryogenesis. However, this may be related to a specific timing, as the total volume may increase only when the egg shell is still “fresh” and “flexible”, already providing an internal volume that will be used in the future, when the legs grow. Anyhow, further investigation is needed to explain this properly.

Another important difference is the color of the yolk, which is white in the progenyleptoidellines and caelopygines (see ***anexo1), and light brown in goniosomatines, allowing the observation of internal changes during cleavage. Another difference refers to the development of the legs, which is completed at the end of phase IV in *A. leucopheus* and *I. pustulosa* (***anexo1), but will only be completed later in the larval organogenesis stage in the goniosomatines. This may be related to the final size of legs, which are proportionally longer in adults of the studied goniosomatines.

Also some characteristics of laniatorean embryogenesis could be better viewed in goniosomatines. For instance, as previously discussed (***anexo1) the abdominal segments appear later in laniatoreans than in eupnoi, and dorsal features appear later than ventral features. This can be observed, for instance, in Fig. 38 (a 25-days embryo): whereas the dorsal “skin” is smooth and represented by the “original” membrane surrounding the yolk, the more lateral “skin” of the body and that covering appendages is granulated, representing the already developed integument. Further, whereas the abdominal segments can be easily recognized ventrally in an older (40-days) embryo, as well as other ventral features (such as spiracles) (as in Fig. 40), they cannot be seen dorsally (Fig. 39).

Comparing the total time of development (Table I) to that of the other studied laniatoreans (*P. quinamavidensis* – Muñoz-Cuevas 1971 – and *A. leucopheus* and *I. pustulosa* – ***anexo1), generally similar values were observed. However, differences occur when the duration of each phase is compared. Phase I+II percentile duration in relation to total time in goniosomatines is similar to that observed in *A. leucopheus* (14 – 16%) and *I. pustulosa* (17 – 18%) and quite smaller than that described for *P. quinamavidensis* (26 – 28%). Phase III is short in goniosomatines in relation to *A. leucopheus* (10 – 13%) and *I. pustulosa* (11 – 12%) but not to *P. quinamavidensis* (6 – 8%). This rapid development of the appendages primordia may be related to the presence of longer legs in the studied goniosomatines, since actually legs take longer to develop in this group as previously discussed. Phase IV has an intermediate duration in the goniosomatines, being closer to the values of *P. quinamavidensis* (17 – 28%) and slightly

smaller than those of *A. leucopheus* (34 – 38%) and *I. pustulosa* (32 – 34%). Phase V has very similar durations in all five laniatoreans, possibly indicating that the amount of time necessary to develop the larval internal organs is a conserved phylogenetic feature. However, when percentile values are concerned, this phase is longer in goniosomatines than in the other species.

When the total duration is taken into account, these values conform those of other groups of harvestmen, such as some Eupnoi (such as the phalangiid *Platybunus bucephalus* (C.L. Koch 1835), which takes approximately 56 days to emerge from the eggs, according to Immel 1955). That is an intermediate situation if compared with other Eupnoi with a long developing duration (such as the phalangiid *Odiellus gallicus*, which emerges after 84 to 162 days, under optimal and worst conditions respectively, after Juberthie 1964) or with the short embryonic development of some Dyspnoi (such as the nemastomatid *Paranemastoma sillii* (Hermann), which emerges after 27 days - Avram 1973). We should stress that, among some temperate species, eggs may hibernate – for instance, among trogulids (Dyspnoi) that reproduce all year around, summer eggs develop within 5-8 weeks, whereas it takes 12-15 weeks for winter eggs (Pabst, 1953). For a comprehensive summary, see Gnaspini (2007: Table 1). Concerning Laniatores, the total duration of the embryonic phase was also measured in a variety of species, from different families and subfamilies (see also Gnaspini 2007), showing that it takes 20-30 days in most Cosmetidae studied, 15-20 days in Manaosbiidae, and, among the Gonyleptidae, around 30 days in Hernandariinae and other Pachylinae, 30-70 days among European Phalangodidae (including cave-dwellers, which may present longer duration due to their subterranean life), and around 20 days in New Zealander Triaenonychidae. The caelopygines and progenyleptoidellines previously studied (**anexo1) as well as the goniosomatines have a somewhat longer duration, what may be either related to their phylogenetic position or their large size in the case of the goniosomatines, but these remain to be tested.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was conducted with financial support from CNPq # 142253/2005-7 to CFL and FAPESP # 00/04686-4 and CNPq # 300326/94-7 and 301839/04-2 to PG.

LITERATURE CITED

Avram S. 1973. Contribution à la connaissance du développement embryonnaire et postembryonnaire chez *Nemastoma* cf. *sillii* Herrman (Opiliones, Nemastomatidae). In: Orghidan T, editor. Livre de cinquantenaire de l'Institut de Spéologie "Émile Racovitza". Academia Republicii Socialiste Romania, Bucuresti. p. 269-303.

- Giribet G, Kury AB. 2007. Phylogeny and biogeography. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 62-87.
- Gnaspini P. 1995. Reproduction and postembryonic development of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from southeastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Invert Repr Dev* 28:137-151.
- Gnaspini P. 1996. Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *J Zool* 239:417-435.
- Gnaspini P. 2007. Development. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 455-472.
- Hara MR, Gnaspini P, Machado G. 2003. Male egg guarding behavior in the neotropical harvestman *Ampheres leucopheus* (Mello-Leitão 1922) (Opiliones, Gonyleptidae). *J Arachnol* 31:441-444.
- Holm A. 1947. On the development of *Opilio parietinus* Deg. *Zool Bid Uppsala* 25:409-422.
- Immel V. 1955. Einige Bemerkungen zur Biologie von *Platybunus bucephalus* (Opiliones, Eupnoi). *Zool Jahrb Abt Syst Ökol Geogr Tiere* 83:475-484.
- Juberthie C. 1964. Recherches sur la biologie des opilions. *Ann Spéleol* 19:5-238.
- Juberthie C, Muñoz-Cuevas A. 1971. Sur la ponte de *Pachylus quinamavidensis* (Opilion, Gonyleptidae). *Bull Soc Hist Nat Toulouse* 107:468-474.
- Machado G, Macías-Ordóñez R. 2007. Reproduction. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 414-454.
- Machado G, Oliveira PS. 1998. Reproductive biology of the neotropical harvestman (*Goniosoma longipes*) (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae): mating, oviposition behaviour, brood mortality, and parental care. *J Zool* 246:359-367.
- Machado G, Pinto-da-Rocha R, Giribet G. 2007. What are harvestmen? In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 1-13.
- Machado G, Raimundo RLG. 2001. Parental investment and the evolution of subsocial behaviour in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Ethol Ecol Evol* 13:133-150.
- Machado G, Requena GS, Buzatto BA, Osses F, Rossetto LM. 2004. Five new cases of paternal care in harvestmen (Arachnida: Opiliones): Implications for the evolution of male guarding in the neotropical family Gonyleptidae. *Sociobiol* 44:577-598.

- Muñoz-Cuevas A. 1971. Étude du développement embryonnaire chez *Pachylus quinamavidensis* (Arachnida, Opiliones, Laniatores). Bull Mus Natl Hist Nat (2) 42:1238-1250.
- Pabst W. 1953. Zur biologie der mitteleuropäischen Troguliden. Zool Jahrb Abt Syst Ökol Geogr Tiere 82:1-46.
- Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G. 2007. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge.
- Shultz J, Pinto-da-Rocha R. 2007. Morphology and functional anatomy. In: Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G, editors. Harvestmen. The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge. p. 14-61.
- Willemart RH, Gnaspini P. 2004. Breeding biology of the cavernicolous harvestman *Goniosoma albiscriptum* (Arachnida: Opiliones: Laniatores): sites of oviposition, egg batches characteristics and subsocial behaviour. Invert Repr Dev 45:15-28.

TABLE 1. Duration (in days) of each phase of the embryonic development of *Goniosoma proximum* and *G. spelaeum*. Abbreviations: I+II = phases I and II (cleavage and germ band formation, III = phase III (metamerization of the prosoma), IV = phase IV (inversion), V = phase V (larval organogenesis), L = larval phase, and TED = total embryonic development (from egg laying to egg hatching) - TED1 is obtained summing the values observed in each phase, and TED2 is taken from observations from the field considering the whole embryonic duration. For comparison reasons, we also added (between parentheses) the percentile duration relatively to TED1.

Species	I	II	III	IV	V	L	TED1	TED2
<i>G. proximum</i>	1 - 2 (3.2- 3.6%)	3 - 6 (9.7- 10.7%)	2 - 4 (6.4- 7.2%)	7 - 15 (22.5- 26.8%)	13 - 20 (35.7- 41.9%)	5 - 9 (16.0- 16.1%)	31 - 56	31 - 48
<i>G. spelaeum</i>	1 - 2 (3.2- 3.4%)	4 - 8 (12.9- 13.8%)	2 - 5 (6.6- 8.6%)	8 - 19 (17.1- 22.9%)	10 - 21 (20.0- 26.3%)	4 - 7 (20.0- 23.7%)	29 - 62	29 - 54

Figure captions

Figs. 1-8. (1-2) Females *G. proximum* and *G. spelaeum*, respectively, taking care of eggs; (3-5) Embryological development of *G. proximum*: (3-4) phase I (cleavage), showing white spots of developing and migrating cells seen against the brownish yolk, (5) phase III (prosoma metamerization), showing the appearance of the parallel ridges on the two opposite sides of the embryo; (6-8) The same for *G. spelaeum*.

Figs. 9-20. Embryological development of *G. proximum*. (9-13) progressive modifications during phase IV (inversion phase): appearance and growth of appendages, appearance of the cardiac tube dividing the body into two lateral lobes, appearance of the abdominal somites (in the form of two to four bulges); (14-20) progressive modifications during phase V (larval organogenesis), showing appearance of the digestive ceca, appearance and development of eye pigmentation and of body pigmentation. The same scale for all figures.

Figs. 21-32. Embryological development of *G. spelaeum*, following the same scheme as in Figs 9-20: (21-25) phase IV; (26-32) phase V. The same scale for all figures.

Figs. 33-36. (33) Larval phase (phase L) of *G. proximum*, showing the final pigmentation pattern of the embryo; (34) First nymph of *G. proximum*; (35-36) Larval phase of *G. spelaeum* (two views).

Figs. 37-40. *Goniosoma proximum*. (37) Four days egg seen under SEM (chorion open), detail: same, view from above; (38) 25-days embryo, dotted square shown on the detail; (39-40) 40-days embryo, dotted square shown on the detail.