



Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

**O uso do olfato nos opiliões *Neosadocus
maximus* e *Mischonyx cuspidatus*
(Arachnida: Opiliones: Laniatores)**



Jéssica Morais Dias

São Paulo

2017

Jéssica Morais Dias

O uso do olfato nos opiliões *Neosadocus maximus* e
Mischonyx cuspidatus (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

The use of olfaction in the harvestmen *Neosadocus*
maximus e *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones:
Laniatores)

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo
Hirata Willemart.

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Dias, Jéssica Morais

O uso do olfato nos opiliões *Neosadocus maximus* e *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

viii+ 61 páginas

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

1. Gonyleptidae
2. Olfacção
3. Químico volátil
4. Agregados
5. Homing
6. Jejum
7. Sensibilidade olfativa
8. Dimorfismo sexual

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Rodrigo Hirata Willemart (orientador)

Dedico essa dissertação aos meus pais, irmão e namorado que sempre me incentivaram a seguir em frente.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações.
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera, a vida já ficou pra trás”*

(Ana Vilela, 2016).

Agradecimentos

- Agradeço aos meus pais (Cláudio e Naria) e ao meu irmão (Cláudio Jr – o Juninho) por todo suporte durante esses dois anos de mestrado e por serem meus grandes incentivadores, sem vocês certamente não teria chegado até aqui. Agradeço por todo carinho, cuidado e preocupação com a minha saúde e bem estar; por todos os conselhos e palavras de consolo; por me ouvirem nos momentos de angústias e aflições (que não foram poucas); por tentarem me acalmar nos momentos de ansiedade; por acreditarem em mim, até mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditava; por me ajudarem a transportar os equipamentos do meu experimento e os animais coletados; por me ajudarem a organizar a sala de experimento. Agradeço imensamente por serem o exemplo de seres humanos que quero seguir.

- Agradeço especialmente ao meu irmão, Juninho, por me ajudar na construção do desenho do olfatômetro dessa dissertação e por me auxiliar na organização dos experimentos.

- Agradeço ao meu orientador Rodrigo por toda orientação acadêmica nesses últimos 4 anos; por me aceitar como aluna no laboratório de pesquisa; pela enorme paciência com os meus erros durante o meu processo de aprendizagem; por confiar em mim nessa dupla jornada que levei nesses anos; pela compreensão da minha disponibilidade acadêmica; por me orientar aos finais de semana e responder meus e-mails durante a madrugada; e sem dúvida alguma por ser uma inspiração profissional.

- Agradeço ao meu namorado (Lucas) por me ajudar a transportar os animais coletados; por todas as frases de incentivo; por toda paciência e compreensão aos finais de semana quando eu não podia sair, viajar ou até mesmo vê-lo; por me ajudar a fugir da rotina insana de mestrado e da profissão de professora; por ser meu companheiro e sempre escutar as minhas “paranoias”; por sempre tentar fazer o melhor pra mim e por me fazer tão bem. Ao seu lado eu esqueço todas as minhas preocupações, minhas frustrações, meus desesperos e minhas angústias. Obrigada também por me ajudar a transportar os animais coletados.

- Agradeço às minhas amigas Juliana e Márcia que me incentivaram a seguir firme nessa caminhada árdua da academia. Obrigada por me ajudarem a relaxar nos momentos de tensão.

- Agradeço a todos os meus familiares (avós, madrinhas, tias, tios, primos e primas) que entenderam os motivos das minhas ausências em festas e almoços familiares. Esses momentos são muito importantes para nós. Prometo que a partir de agora vou almoçar com mais frequência aos domingos na sua casa vó.
- Agradeço às minhas amigas e parceiras de trabalho Lívia Dorice, Carolina Oreb e Mariana Lorenzin por todo incentivo e por me escutarem nos momentos mais difíceis. Tive sorte em conhecer grandes profissionais como vocês.
- Agradeço à minha coordenadora Cristina Mattos Assumpção por me conceder alguns dias no colégio para que eu pudesse fazer algumas disciplinas do mestrado.
- Agradeço carinhosamente aos meus colegas de laboratório (Thay, Gui, Gabi, Júlio, Avatar, Norton e Nathi) por sempre ajudarem com sugestões e críticas construtivas e por todo companheirismo nesses últimos anos.
- Agradeço especialmente ao meu orientador Rodrigo, Júlio, Gui, Gabi, Norton e Rafael por se prontificarem a me acompanhar em campo; por me ajudarem nas coletas e no transporte dos animais; por me dar suporte na organização dos animais pós-coleta; por toda paciência e persistência durante o campo.
- Agradeço à Thay e ao Gui por toda ajuda com os estudos para a prova de ingresso do mestrado.
- Agradeço às minhas amigas da época do colégio Sheila (a Loira) e a Thalyta por todo alento que só vocês conseguem em dar.
- Agradeço ao CNPq e à FAPESP, pelo financiamento do projeto.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Introdução Geral | 1 |
| Referências Bibliográficas | 4 |
| O uso do olfato em machos do opilião <i>Mischonyx cuspidatus</i> (Arachnida: Opiliones: Laniatores) | 7 |
| Resumo | 8 |
| Abstract | 8 |
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Material e Métodos | 12 |
| 2.1. Coleta e manutenção no laboratório | 12 |
| 2.2. Procedimentos experimentais | 12 |
| 2.3. Experimento 1: atração por coespecífico | 15 |
| 2.4. Experimento 2: atração por abrigo | 15 |
| 3. Resultados | 16 |
| 3.1. Experimento 1: atração por coespecífico | 16 |
| 3.2. Experimento 2: atração por abrigo | 17 |
| 4. Discussão | 18 |
| 5. Referência Bibliográfica | 23 |
| O opilião <i>Neosadocus maximus</i> (Arachnida: Opiliones) utiliza o olfato para retornar ao abrigo | 31 |
| Resumo | 32 |
| Abstract | 32 |
| 1. Introdução | 33 |
| 2. Material e Métodos | 34 |
| 2.1. Coleta e manutenção no laboratório | 34 |
| 2.2. Ensaios comportamentais | 34 |
| 2.3. Experimento: Atração por abrigo | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Resultados | 37 |
| 3.1. Experimento 1: Atração por abrigo | 37 |
| 3.2. Comportamento dos animais no Y | 38 |
| 4. Discussão | 38 |
| 5. Referências Bibliográficas | 41 |
| Efeito do jejum no olfato do opilião <i>Mischonyx cuspidatus</i> (Arachnida: Opiliones: Laniatores) | 46 |
| Resumo | 47 |
| Abstract | 47 |
| 1. Introdução | 49 |
| 2. Material e Métodos | 50 |
| 2.1. Coleta e manutenção no laboratório | 50 |
| 2.2. Procedimentos experimentais | 50 |
| 2.3. Preparo do estímulo odor de banana | 53 |
| 2.4. Experimento: atração por odor de banana | 53 |
| 3. Resultados | 53 |
| 3.1. Experimento: atração por odor de banana | 53 |
| 3.2. Comportamento dos animais no olfatômetro | 54 |
| 4. Discussão | 54 |
| 5. Referências Bibliográficas | 57 |
| Conclusão Geral | 61 |

Introdução Geral

Opiliones é a terceira maior Ordem em Arachnida com 6.653 espécies descritas em quatro subordens viventes: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi e Laniatores (Giribet & Sharma, 2015; Kury, 2017). Os Opiliones podem viver solitários ou agregados e podem ser encontrados na serapilheira, em cavernas, na vegetação, sob rochas e troncos de árvores caídos (Curtis & Machado, 2007). São animais onívoros cuja alimentação se baseia em frutas, fungos e pequenos invertebrados vivos ou mortos (Curtis & Machado, 2007). São majoritariamente noturnos e durante o dia se abrigam em fendas no solo e em rochas, na vegetação, em cavernas e sob troncos caídos no substrato (Curtis & Machado, 2007; Machado & Macías-Ordóñez, 2007; Chelini et al., 2011). Aparentemente a reprodução pode ocorrer durante todo o ano (Machado & Oliveira, 1998). Após a cópula, as fêmeas podem depositar seus ovos no interior do solo, sobre folhas da vegetação, em rochas ou nas paredes das cavernas (Machado & Macías-Ordóñez, 2007). Algumas espécies exibem o comportamento de cuidado maternal ou paternal, cuidando de suas desovas após a oviposição (Machado & Oliveira, 1998; Machado & Oliveira, 2002).

Opiliones são conhecidos por terem baixa acuidade visual, baixa percepção de estímulos mecânicos e por serem altamente dependentes da quimiorrecepção, especialmente a quimiorrecepção de contato (Willemart et al., 2009). A quimiorrecepção de contato é a modalidade sensorial mais documentada nos contextos de alimentação, de predação e de detecção de parceiros sexuais (Willemart et al., 2009). Recentemente uma grande variedade de receptores olfativos nas pernas I e II foi descrita na subordem Laniatores (Gainett et al., 2017). E o uso do olfato já foi documentado a curta distância (< 2 cm) nos contextos de alimentação, aprendizagem associativa e de detecção de químicos de alarme (Machado et al., 2002; Willemart & Chelini, 2007; Costa & Willemart, 2013; Santos et al., 2013). Com essas recentes evidências a olfação parece desempenhar um importante papel.

Laniatores é a maior Subordem em Opiliones com 4.248 espécies descritas até o momento entre espécies solitárias e gregárias (Kury, 2017). Espécies gregárias comumente saem do abrigo ao anoitecer para forragear e ao amanhecer retornam ao

abrigo de repouso (Gnaspini, 1996; Machado et al., 2000; Willemart & Gnaspini, 2004). Em Laniatores, até o momento não sabemos quais pistas esses animais utilizam para retornar ao abrigo, mas em outra subordem de Opiliones há evidências que pistas químicas de coespecíficos são utilizadas durante o retorno ao ambiente de repouso (Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007; Harvey et al., 2017). Apesar dessas evidências, não se sabe se as pistas químicas utilizadas pelos indivíduos são voláteis ou de contato. Em Laniatores, sabe-se que indivíduos associam pistas químicas voláteis do ambiente ao abrigo (Santos et al., 2013). Dessa forma, pistas químicas voláteis de coespecíficos poderiam contribuir com o retorno de espécies gregárias ao abrigo, mas nenhuma hipótese nesse sentido foi testada experimentalmente na subordem Laniatores.

No opilião *Neosadocus maximus* (Gonyleptidae) (espécie não gregária), as fêmeas que exibem o comportamento de cuidado maternal desertam voluntariamente suas desovas para forragear (Chelini & Machado, 2011, 2012). As fêmeas de *N. maximus* já foram observadas forrageando a uma distância de até 1,5 metros de distância de suas desovas (Chelini & Machado, 2012). Até o momento, não sabemos quais pistas essas fêmeas usam para retornar às suas desovas. De maneira geral, químicos têm sido sugeridos como mediadores de retorno ao abrigo em Laniatores (Gnaspini, 1996; Fernandes & Willemart, 2014; Murayama & Willemart, 2015). O comportamento que sugere marcação química, a raspagem de partes do corpo no substrato, já foi observado em indivíduos de *N. maximus* (Willemart et al., 2007). Dito isso, talvez pistas químicas voláteis deixadas previamente nos ambientes de oviposição ou em abrigos desses indivíduos podem mediar o retorno deles a esses ambientes.

No contexto de alimentação, também há evidências de que indivíduos em jejum usam pistas voláteis à curta distância (< 1 cm) para localizar a presa (Costa et al., 2016). Antes de capturar o alimento esses animais apontam as pernas I e II à presa (Costa et al., 2016). Esse comportamento tem sido sugerido como uma tentativa do indivíduo em obter informações do ambiente, como químicos voláteis (Willemart & Chelini, 2007). Em Insecta, o jejum pode aumentar a sensibilidade olfativa no contexto de alimentação (McIntyre & Vaughn, 1997; Farhadian et al., 2012; Reisenman et al., 2013). Curiosamente em Arachnida, até onde sabemos, não há registros da alteração da sensibilidade olfativa durante o jejum. Dessa forma, seria interessante testar os possíveis

efeitos do jejum no uso da olfação nessa classe, especialmente na ordem Opiliones em que o cenário da dependência de quimiorrecepção de contato vem mudando nos últimos anos.

Dividimos essa dissertação em três capítulos: No primeiro capítulo (O uso do olfato em machos do opilião *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones: Laniatores)) testamos se opiliões gregários utilizam pistas químicas voláteis para encontrar o abrigo. No segundo capítulo (O opilião *Neosadocus maximus* (Arachnida: Opiliones) utiliza o olfato para retornar ao abrigo) testamos se o opilião *N. maximus* retorna ao abrigo por meio de químicos próprios voláteis deixados previamente no abrigo. No terceiro capítulo (Efeito do jejum no olfato do opilião *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones: Laniatores)) testamos se o opilião *M. cuspidatus* (Gonyleptidae) são atraídos aos odores de alimento durante o jejum reduzido e prolongado.

Referências Bibliográficas

Chelini, M. C. & Machado, G. (2011). Cuidado maternal no opilião *Neosadocus maximus* (Arachnida: Opiliones). Tese (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chelini, M. C. & Machado, G. (2012). Costs and benefits of temporary brood desertion in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 1619–1627.

Chelini, M-C., Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2011). Caves as a winter refuge by a neotropical harvestman (Arachnida, Opiliones). *Journal of Insect Behavior* 24:393–398.

Costa, T. M. & Willemart, R. H. (2013). First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. *Zoologia* 30: 359-361.

Costa, T. M., Silva, N. F. S. & Willemart, R. H. (2016). Prey capture behavior in three neotropical armored harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Journal of Ethology* 34: 183-190.

Curtis, D. J. & Machado, G. (2007). Ecology. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard university press, Cambridge, MA, USA, pp. 290-308.

Donaldson, Z. R. & Grether, G. F. (2007). Tradition without social learning: scent-mark-based communal roost formation in a neotropical harvestman (*Prionostemma* sp.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 801–809.

Fernandes, N. S. & Willemart R. H. (2014). Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. *Comptes Rendus Biologies* 337: 269-275.

Gainett, G., Michalik, P., Muller, C., Giribet, G., Talarico, G. & Willemart, R.H. (2017). Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and

evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). *Arthropod Structure & Development* 46: 178–195.

Giribet G. & Sharma P. P. (2015). Evolutionary biology of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Annual Review Entomology* 60: 157–75.

Gnaspini, P. (1996). Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Zoology* 239: 417-435.

Grether, G. F. & Donaldson, Z. R. (2007). Communal roost site selection in a neotropical harvestman: habitat limitation vs. tradition. *Ethology* 113: 290–300.

Harvey, B. D., Vanni, K. N., Shier, D. M. & Grether, G. F. (2017). Experimental test of the mechanism underlying sexual segregation at communal roosts of harvestmen (*Prionostemma* spp.). *Ethology* 123: 516–525.

Kury, A. B. (2017). Classification of Opiliones. Museu Nacional/ UFRJ Website. URL: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.

Machado, G. & Macías-Ordóñez, R. (2007). Social behavior. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 400-413.

Machado, G. & Oliveira, P. S. (1998). Reproductive biology of the neotropical harvestman (*Goniosoma longipes*) (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae): Mating and oviposition behaviour, brood mortality, and parental care. *Journal of Zoology* 246: 359-367.

Machado, G., Bonato, V. & Oliveira P.S. (2002). Alarm communication: A new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Naturwissenschaften* 89: 357–360.

Machado, G., Raimundo, R. L. G. & Oliveira, P. S. (2000). Daily activity schedule, gregariousness, and defensive behaviour in the neotropical harvestman *Goniosoma longipes* (Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Natural History* 34: 587–596.

Murayama, G. P. & Willemart, R. H. (2015). Mode of use of sexually dimorphic glands in a neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. *Journal of Natural History* 49: 1937-1947.

Santos, G. C., Hogan, J. A. & Willemart, R. H. (2013). Associative learning in a harvestman (Arachnida, Opiliones). *Behavioural Processes* 100: 64–66.

Willemart, R. H. & Chelini, M. C. (2007). Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 73-79.

Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2004). Spatial distribution, mobility, gregariousness, and defensive behaviour in a Brazilian cave harvestman *Goniosoma albiscriptum* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *Animal Biology* 54: 221-235.

Willemart, R. H., Chelini, M. C., Andrade, R. & Gnaspini, P. (2007). An ethological approach to a SEM survey on sensory structures and tegumental gland openings of two neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *Italian Journal of Zoology* 74: 39-54.

Willemart, R. H., Farine, J.-P. & Gnaspini, P. (2009). Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. *Acta Zoologica* 90: 209–227.

O uso do olfato em machos do opilião *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Jéssica Morais Dias^{1,2} e Rodrigo Hirata Willemart^{1,2,3*}

¹ Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes, Escola de Artes Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*E-mail: willemart@usp.br

Palavras-chave: Opiliones, Laniatores, olfação, quimiorrecepção à distância, químico volátil, agregados.

Resumo

O comportamento gregário é comum em algumas espécies de Opiliones. No período noturno indivíduos gregários saem do abrigo para forragear e ao amanhecer retornam ao ambiente de repouso. Químicos de coespecíficos têm sido discutidos como mediadores do retorno ao abrigo nos indivíduos da subordem Eupnoi, mas até o momento nada se sabe sobre as pistas que os indivíduos da subordem Laniatores utilizam para retornar ao abrigo. Recentemente, uma grande diversidade de receptores olfativos foi descrita nessa subordem e o uso do olfato à curta distância (< 2 cm) já foi documentado em agregados. Testamos as hipóteses do uso do olfato à longa distância (50 cm) na atração por (1) químicos voláteis emitidos diretamente de coespecíficos e (2) químicos voláteis próprios e de coespecíficos deixados previamente nos abrigos. Utilizamos um olfatômetro em formato de Y. Usamos como estímulos fêmeas e machos coespecíficos para testar a hipótese (1) e abrigos dos sujeitos experimentais, de coespecífico do mesmo sexo e controle para testar a hipótese (2). Para (1) machos de *M. cuspidatus* escolheram significativamente o lado do olfatômetro com machos coespecíficos. Fêmeas de *M. cuspidatus* não mostraram preferência por nenhum dos estímulos. Para (2) machos e fêmeas de *M. cuspidatus* não escolheram significativamente nenhum estímulo do olfatômetro. Esses resultados nos mostram que talvez machos de *M. cuspidatus* tenham maior sensibilidade olfativa comparada ao das fêmeas coespecíficas. Os machos de *M. cuspidatus* não mostraram preferência por fêmeas coespecíficas talvez porque no momento do experimento as fêmeas não estivessem liberando voláteis. Nossos resultados também mostram que indivíduos de *M. cuspidatus* não são atraídos à distância por químicos deixados no abrigo, talvez porque esses químicos sejam pouco voláteis ou porque os indivíduos detectaram o odor, mas optaram por não escolher o braço com odor próprio e nem de coespecífico. O olfato parece ser mais importante do que anteriormente mencionado em Opiliones.

Abstract

Gregarious behavior is common in some species of Opiliones. At night, gregarious individuals leave their shelter to forage and at dawn return to the original spot. Chemicals of conspecifics have been suggested to be mediators of homing in individuals of the suborder Eupnoi, but so far nothing is known about the cues used in

the suborder Laniatores. Recently, a large diversity of olfactory receptors has been described in this suborder and the use of olfaction at close range (<2 cm) has already been documented in aggregations. We tested the hypotheses of the use of olfaction at long range (50 cm) in the attraction by (1) volatile chemicals emitted directly from conspecifics and (2) volatiles (own chemicals and conspecific chemicals) previously left in shelters. We used a Y-shaped olfactometer. We used conspecific females and males as stimuli for (1) and shelters of the experimental subjects and of conspecifics of the same sex for (2). For (1) males of *M. cuspidatus* chose significantly the side of the olfactometer with conspecifics males. Females did not choose any stimuli. For (2) males and females of *M. cuspidatus* did not choose any of the stimuli. Males may therefore be more sensitive than females. Males of *M. cuspidatus* did not show preference for conspecific females, perhaps because at the time of the experiment females were not releasing volatiles. Individuals of *M. cuspidatus* are not attracted at a distance by chemicals left in the shelter, perhaps because these chemicals are not volatile or because the individuals detected the odor, but chose not to walk towards it. Olfaction seems to be more important than previously mentioned in Opiliones.

1. Introdução

A agregação é um comportamento comum entre animais (Sinclair, 1985; Cornell et al., 1987; Graves & Duvall, 1987; Treves, 2000; Parrish et al., 2002; Romey & Wallace, 2007). Inúmeros benefícios têm sido atribuídos à formação gregária, como a defesa contra predadores (Lendrem, 1984; Romey & Wallace, 2007), aquisição de alimentos (Berger, 1978; Bartelt et al., 1985), sucesso de acasalamento (Vanderbilt et al., 1998), termo e hidrorregulação (Klok & Chown, 1999). Os animais podem se agregar utilizando pistas acústicas, visuais ou químicas (Hassanali et al., 2005; Wyatt, 2014).

Em invertebrados, a agregação mediada por químicos é bem documentada em Insecta (espécies sociais: Butler et al., 1969; Hölldobler & Wilson, 1978; Rottler et al., 2013; espécies não sociais: Rivault & Cloarec, 1998; Ame et al., 2004; Durieux et al., 2012). Em baratas, a agregação dos indivíduos de *Blattella germanica* (Blattellidae) ocorre por meio de químicos de contato deixados no substrato por coespecíficos (Rivault & Cloarec, 1998). Em besouros, indivíduos de *Harmonia axyridis* (Coccinellidae) também deixam químicos de contato no substrato, os quais induzem a formação gregária (Durieux et al., 2012). Já na espécie *Sitophilus granarius* (Curculionidae), a formação do agregado pode ser mediada por químicos voláteis emitidos da cutícula dos machos (Faustini et al., 1982). Em gafanhotos, os químicos voláteis da cutícula dos machos adultos de *Schistocerca gregaria* (Acrididae) medeiam a atração de coespecíficos adultos para a agregação (Torto et al., 1994).

Em Arachnida, o comportamento gregário em adultos já foi documentado nas ordens Araneae, Acari, Amblypygi, Scorpiones e Opiliones (Polis, 1990; Warburg, 2000; Rayor & Taylor, 2006; Machado & Macías-Ordóñez, 2007; Carr & Roe, 2016; Fitzgerald & Ives, 2017). A ordem Opiliones tem 6.653 espécies descritas em quatro subordens viventes: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi e Laniatores (Giribet & Sharma, 2015; Kury, 2017). Até o momento, o comportamento gregário foi observado em Eupnoi e Laniatores (Machado & Macías-Ordóñez, 2007). Dentre as hipóteses que têm sido propostas para a formação gregária nessa ordem estão a proteção contra predadores, hidrorregulação e aumento do sucesso de acasalamento (Machado & Macías-Ordóñez, 2007). Os indivíduos gregários comumente repousam em locais

úmidos, sob troncos, cavernas ou vegetação (Curtis & Machado, 2007; Machado & Macías-Ordóñez, 2007; Chelini et al., 2011) e há evidência de filopatria em diversas espécies: durante a noite, os indivíduos dos agregados saem para forragear e ao amanhecer retornam ao ambiente de repouso (Gnaspini, 1996; Machado et al., 2000; Willemart & Gnaspini, 2004; Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007). Como esses animais reencontram o ambiente de onde saíram?

Em Eupnoi, há evidências que o retorno ao abrigo de indivíduos ocorre por meio de químicos de coespecíficos deixados no ambiente (Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007; Harvey et al., 2017). A atração por químicos de coespecíficos parece manter a fidelidade dos indivíduos àquele ambiente (Teng et al., 2012), o que explicaria o retorno desses animais dia após dia ao abrigo. No entanto, até o momento não se sabe se esses químicos deixados no ambiente são químicos de contato ou voláteis. Em Laniatores, ainda não se sabe quais pistas os animais usam para retornar ao local de origem e aos agregados, que não necessariamente são compostos sempre pelos mesmos indivíduos (Machado et al., 2000; Willemart & Gnaspini, 2004; Chelini et al., 2012).

A olfação é relativamente bem documentada em algumas ordens de Arachnida (Araneae: Hostettler & Nentwig, 2006; Nelson et al., 2012; Dodson et al., 2013; Amblypygi: Hebets & Chapman, 2000; Walsh & Rayor, 2008; Santer & Hebets, 2011; Hebets et al., 2014; Acari: Zhong et al., 2011; Soares & Borges, 2012; Onzo et al., 2012; Carr et al., 2013; Silva et al., 2014), mas tem sido pouco explorada na ordem Opiliones (Willemart et al., 2009). Recentemente, Gainett et al. (2017) descreveram uma grande diversidade de receptores olfativos nas pernas I e II na subordem Laniatores. E nessa subordem há evidências comportamentais do uso do olfato a curta distância (< 2 cm), incluindo a comunicação intraespecífica em agregados (Machado et al., 2002; Willemart & Chelini, 2007; Costa & Willemart, 2013; Costa et al., 2016). Sabe-se também que Laniatores podem associar pistas químicas voláteis do ambiente ao seu abrigo (Santos et al., 2013). Logo, pistas olfativas podem contribuir para o retorno de indivíduos ao abrigo e talvez a olfação tenha um papel mais importante do que atualmente é considerado na literatura de Opiliones.

Nesse trabalho utilizamos o opilião noturno e gregário (Mestre & Pinto-da-Rocha, 2004) *Mischonyx cuspidatus* Roewer, 1913 (Gonyleptidae) para testar se opiliões gregários podem utilizar pistas olfativas para encontrar o abrigo e os coespecíficos com que se agregam. Testamos duas maneiras desse encontro ocorrer: (1) pela detecção de voláteis emitidos por coespecíficos ou (2) pela detecção de voláteis deixados no abrigo pelo próprio indivíduo ou por coespecíficos.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e manutenção no laboratório

Coletamos manualmente 150 machos e 70 fêmeas de *M. cuspidatus* sob troncos no Parque Ecológico do Tietê (23° 29' 46" S, 46° 31' 10"W), na cidade de São Paulo – Brasil, em novembro de 2016. Mantivemos os opiliões no laboratório, individualmente em recipientes de plástico transparente (12 cm x 8 cm x altura 4 cm), com terra vegetal umedecida, abrigo e algodão umedecido. Alimentamos os animais uma vez por semana, intercalando os seguintes alimentos: banana nanica (*Musa* spp.), grilo (*Gryllus* sp.) e massa de macarrão cozida.

2.2. Procedimentos experimentais

Utilizamos um olfatômetro de vidro transparente com formato de Y (Fig.1) para testar se indivíduos de *M. cuspidatus* são atraídos à longa distância por químicos. Na extremidade de cada um dos três braços do olfatômetro havia um terminal, chamados aqui de A, B e C, de vidro acoplado (Fig.1A; 1B; 1C). O intuito do terminal de vidro era de impedir a saída do animal e permitir a entrada e saída de ar do olfatômetro. Mangueiras de silicone conectavam os terminais de dois braços aos potes de vidro transparente e hermeticamente fechados (Fig. 1D) (diâmetro 9 cm x altura 17 cm), onde colocamos os estímulos de cada combinação. Em uma das combinações utilizamos como estímulo indivíduos de *M. cuspidatus* vivos. Para minimizar os possíveis efeitos de vibrações provocados por esses animais no olfatômetro e assim influenciar a escolha do sujeito experimental colocamos esses potes externamente ao olfatômetro (ver Fig. 1). Ao redor de cada pote havia uma folha de EVA preta para evitar que pistas visuais

influenciassem a escolha dos sujeitos experimentais. Uma segunda mangueira de silicone ligava os potes dos estímulos aos fluxímetros de ar (Fig. 1E) (Ki Key Instrumentos). A velocidade do ar, medida pelo fluxímetro, era de 1 L/m nos braços dos terminais A e B e 2 L/m no braço do terminal C. A bomba de ar (Prismatec – Bombas de vácuo) sugava ar do ambiente que era previamente filtrado por um carvão ativado (Trigon Technologies). Por fim outra mangueira de silicone acoplada ao terminal C direcionava o ar de dentro do olfatômetro para fora da sala de laboratório com o objetivo de minimizar as chances desse ar ser reintroduzido novamente no olfatômetro.

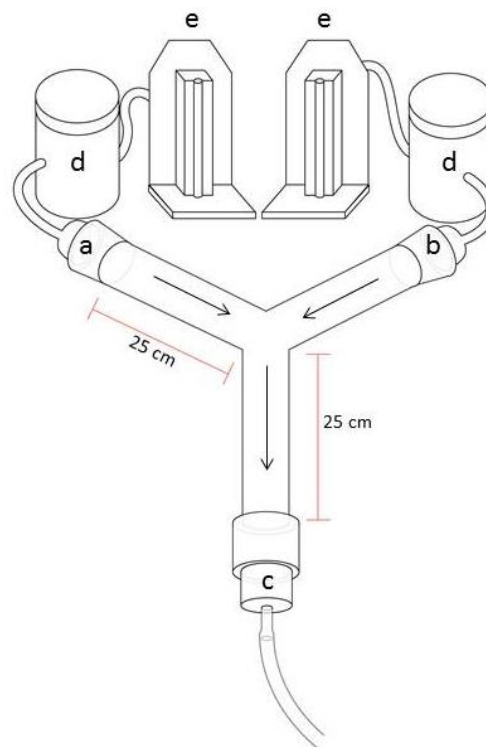


Figura 1. Representação do olfatômetro de vidro transparente em formato de Y, com os terminais de vidro (A, B e C) conectados nas extremidades. Os sujeitos experimentais eram aclimatizados por 3 min no terminal 1C. Os potes hermeticamente fechados (D) conectados por mangueiras de silicone aos terminais e aos fluxímetros de ar (E). As setas indicam a direção unilateral do ar.

A cada teste colocamos os sujeitos experimentais no terminal C e os aclimatizamos por 3 min com o fluxo de ar ativado. Durante este período, uma barreira de rede de Nylon impedia o deslocamento do sujeito experimental para os braços do olfatômetro. Em seguida, retiramos a barreira vagarosamente para que o sujeito experimental tivesse acesso aos braços do olfatômetro. Consideramos como escolha o

braço em que o sujeito experimental entrou primeiro com o corpo inteiro. O tempo máximo de cada teste era de 20 min.

Para minimizar a influência da vibração produzida pela bomba de ar na sala, colocamos o olfatômetro sobre uma mesa de granito (material que atenua a transmissão de vibrações) (Elias et al., 2004; Hebets, 2004) e uma folha de EVA (espessura 0,5 cm). Colocamos a bomba de ar no chão, em cima de uma placa de granito (espessura 2 cm) e isopor (espessura 4,5 cm). Para minimizar eventuais interferências de pistas visuais do ambiente na escolha do braço do olfatômetro pelos sujeitos experimentais, utilizamos uma barreira de isopor com EVA preto nas partes laterais e superior do olfatômetro (ver fig.2). Após cada teste limpamos o olfatômetro, os terminais de vidro, os potes dos estímulos e as mangueiras de silicone com álcool 70% e secamos com um ventilador por aproximadamente 15min. Realizamos os experimentos entre 20h00 e 00h00 nos meses de setembro a dezembro de 2016. As médias de temperatura e umidade relativa no laboratório foram, respectivamente, de 20°C (min: 18°C; máx: 24,4°C; desv pad = 1,9; n = 15) e 84% (min: 80%; máx: 90,6%; desv pad = 3,7 n = 15). Colocamos um papel filtro (5 x 3 cm) submerso por 5 segundos em água em temperatura ambiente no interior dos potes hermeticamente fechados com o intuito de manter a umidade no interior do olfatômetro. Trocamos os papéis filtros umedecidos a cada teste.

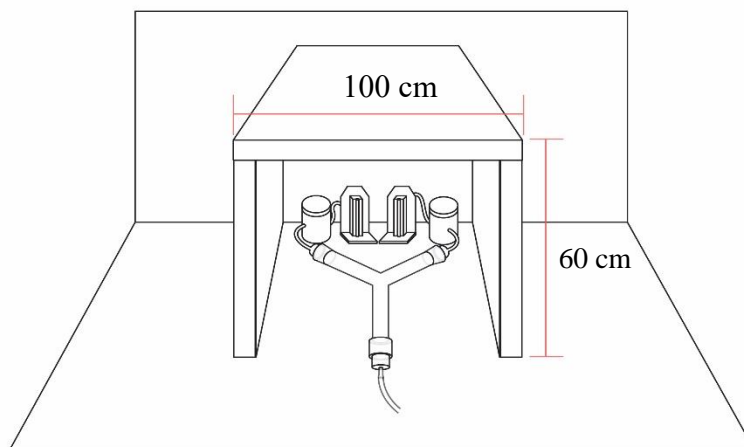


Figura 2. Representação da barreira de isopor preto nas laterais e parte superior do olfatômetro.

Para a análise estatística utilizamos o teste Qui-quadrado que compara as escolhas dos sujeitos experimentais com o resultado esperado de 50% para cada braço do olfatômetro caso a escolha se dê ao acaso. Realizamos a análise separadamente para

cada combinação dos experimentos de atração por químicos voláteis emitidos diretamente de um coespecífico e atração por químicos voláteis próprios e de coespecíficos deixados previamente no abrigo (ver abaixo).

2.3. Experimento 1: atração por coespecífico

No experimento de atração por coespecífico testamos se machos ($n = 20$) e fêmeas ($n = 20$) de *M. cuspidatus* são atraídos pelo odor de coespecíficos do mesmo sexo e do sexo oposto. Dividimos o experimento em três combinações com os seguintes estímulos: (1) fêmea X papel filtro umedecido; (2) macho X papel filtro umedecido; (3) fêmea X macho. Nossa previsão era de que os sujeitos experimentais de *M. cuspidatus* escolheriam o lado do olfatômetro com coespecífico nas combinações (1) e (2) e na combinação (3) a escolha seria de 50% para cada lado dos braços do olfatômetro. A cada teste trocamos o estímulo e o lado do estímulo para evitar qualquer interferência dos lados do olfatômetro na escolha pelo sujeito experimental.

2.4. Experimento 2: atração por abrigo

Testamos se os machos ($n = 15$) sujeitos experimentais são atraídos por voláteis deixados no abrigo pelo próprio indivíduo ou por machos coespecíficos. Devido ao número grande de combinações necessárias nesta etapa, optamos por fazer os testes com um único sexo. Escolhemos os machos porque os encontramos em maior número na coleta. Testamos cada indivíduo uma única vez em somente uma das combinações.

Utilizamos partes de caixas de ovos de papel rugoso como abrigos. Usamos três tipos de abrigos como estímulos: o abrigo próprio (com químico do sujeito experimental), o abrigo coespecífico (com químico do macho coespecífico) e o abrigo controle (sem químico do sujeito experimental e de nenhum outro coespecífico). Para impregnar os abrigos, primeiramente os submergimos em água em temperatura ambiente durante 5 segundos. Em seguida, colocamos os em terrários sobre uma camada de terra vegetal umedecida com 5 mL de água dispersa por um borrifador. Mantivemos os terrários com opiliões (abrigo próprio e coespecífico) e sem opiliões (abrigo controle) nas mesmas condições de temperatura e luminosidade durante 7 dias.

Dividimos o experimento em seis combinações com os seguintes estímulos: (1) abrigo próprio X abrigo controle; (2) abrigo próprio X papel filtro umedecido; (3) abrigo controle X papel filtro umedecido; (4) abrigo de macho coespecífico X papel filtro umedecido; (5) abrigo de macho coespecífico X abrigo controle; (6) abrigo de macho coespecífico X abrigo próprio. A previsão para as combinações (1) e (2) era de que os sujeitos experimentais escolheriam o lado do braço com o estímulo abrigo próprio. Para as combinações (4) e (5) a previsão era de que os sujeitos experimentais escolheriam o lado do braço com o estímulo abrigo de macho coespecífico. E para as combinações (3) e (6) a previsão de escolha seria de 50% para cada lado dos braços do olfatômetro. A cada teste trocamos o lado do estímulo para minimizar eventual influência dos lados do olfatômetro na escolha dos sujeitos experimentais.

3. Resultados

3.1. Experimento 1: atração por coespecífico

Os machos de *M. cuspidatus* escolheram significativamente mais o lado do olfatômetro com o estímulo macho coespecífico na combinação 2, cujos estímulos foram: macho X papel filtro umedecido ($P < 0,001$) (tabela 1). Nas demais combinações (1 e 3) não houve diferença significativa na escolha dos machos por um dos estímulos (tabela 1). Para as fêmeas de *M. cuspidatus* não houve diferença significativa na escolha por um dos estímulos nas três combinações (tabela 2).

Tabela 1: Escolhas feitas por machos do opilião *Mischonyx cuspidatus* em três combinações de estímulos num olfatômetro de Y (n = 20; $GL = 1$).

| Combinação | Estímulos | Número de escolhas | χ^2 | P |
|------------|------------------------|--------------------|----------|---------|
| 1 | Fêmea | 12 | 0,80 | 0,3711 |
| | Papel filtro umedecido | 8 | | |
| 2 | Macho | 19 | 16,20 | <0,0001 |
| | Papel filtro umedecido | 1 | | |
| 3 | Macho | 10 | 0,00 | 1,0000 |
| | Fêmea | 10 | | |

Tabela 2: Escolhas feitas por fêmeas do opilião *Mischonyx cuspidatus* em três combinações de estímulos num olfatômetro de Y (n = 20; $GL = 1$).

| Combinação | Estímulos | Número de escolhas | χ^2 | P |
|------------|------------------------|--------------------|----------|--------|
| 1 | Fêmea | 9 | 0,80 | 0,3711 |
| | Papel filtro umedecido | 11 | | |
| 2 | Macho | 14 | 3,20 | 0,0736 |
| | Papel filtro umedecido | 6 | | |
| 3 | Macho | 9 | 0,20 | 0,6547 |
| | Fêmea | 11 | | |

3.2. Experimento 2: atração por abrigo

Nas seis combinações não houve diferença significativa na escolha dos machos de *M. cuspidatus* por um dos estímulos (tabela 3).

Tabela 3: Escolhas feitas por machos do opilião *Mischonyx cuspidatus* em seis combinações de estímulos num olfatômetro de Y ($n = 15$; $GL = 1$).

| Combinação | Estímulos | Número de escolhas | χ^2 | <i>P</i> |
|-------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|
| 1 | Abrigo próprio | 8 | 0,067 | 0,796 |
| | Abrigo controle | 9 | | |
| 2 | Abrigo próprio | 11 | 3,26 | 0,070 |
| | Papel filtro umedecido | 4 | | |
| 3 | Abrigo controle | 10 | 1,66 | 0,196 |
| | Papel filtro umedecido | 5 | | |
| 4 | Abrigo coespecífico | 7 | 0,067 | 0,796 |
| | Papel filtro umedecido | 8 | | |
| 5 | Abrigo coespecífico | 11 | 3,26 | 0,070 |
| | Abrigo controle | 4 | | |
| 6 | Abrigo coespecífico | 7 | 0,067 | 0,796 |
| | Abrigo próprio | 8 | | |

1.1. Comportamento dos animais no olfatômetro

Ao caminharem pelo olfatômetro, os sujeitos experimentais ficaram com as pernas I e II esticadas à frente do corpo exibindo movimentos dorsoventrais e por vezes tocaram a parede do olfatômetro.

4. Discussão

Os machos de *M. cuspidatus* escolheram o lado do olfatômetro com machos coespecíficos, mas não foram atraídos à distância por fêmeas coespecíficas. Já as fêmeas não foram atraídas nem por machos e nem por fêmeas. Machos de *M. cuspidatus* não foram atraídos à longa distância (50 cm) pelo odor do próprio abrigo e nem pelo odor de abrigos de machos coespecíficos.

Na subordem Eupnoi há evidências da atração por químicos de coespecífico durante o retorno ao abrigo (Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007).

Recentemente foi documentado que ambientes de repouso de machos de *Prionostemma* sp. atraem machos coespecíficos e uma possível explicação para essa atração está relacionada ao maior deslocamento deles (Grether et al., 2014; Harvey et al., 2017). De maneira geral, machos de *Prionostemma* sp. parecem andar mais que fêmeas coespecíficas no ambiente e por essa razão eles podem encontrar o ambiente de repouso antes das fêmeas, resultando em um agregado temporário com viés de machos (Grether et al., 2014). Mas no opilião *M. cuspidatus* os machos e fêmeas exploram o ambiente na mesma proporção ao menos no período do ano estudado por Pereira et al. (2004). Por conta das possíveis diferenças sazonais de deslocamento, não podemos descartar que machos andem mais que fêmeas na época reprodutiva. Nossos resultados mostram que machos de *M. cuspidatus* escolhem preferencialmente machos coespecíficos por meio de químicos voláteis. Talvez a preferência de machos por machos possa favorecer a formação inicial de agregados de *M. cuspidatus*, dessa forma, considerando que a atração entre os indivíduos ocorre por meio de químicos voláteis de coespecíficos, seria esperado que fêmeas de *M. cuspidatus* também fossem atraídas por fêmeas ou machos coespecíficos. Mas por que só machos de *M. cuspidatus* exibiram preferência por machos coespecíficos à longa distância e fêmeas de *M. cuspidatus* não?

Uma possibilidade é que machos de *M. cuspidatus* possuam olfato mais sensível que as fêmeas coespecíficas, visto que as fêmeas não mostraram preferência nem por fêmeas e nem por machos coespecíficos. Outra evidência para a maior sensibilidade olfativa dos machos é que machos de *M. cuspidatus* também foram atraídos à distância por químicos de alimento, enquanto que as fêmeas não foram atraídas (Dias & Willemart, dados não publicados). Apesar de sugerirmos que machos de *M. cuspidatus* tenham o olfato mais sensível que o das fêmeas, eles não foram atraídos à distância por fêmeas coespecíficas. Uma possível explicação para esse resultado é que no momento do experimento as fêmeas de *M. cuspidatus* não estivessem liberando químicos voláteis de atração de coespecíficos. Fêmeas de aranhas emitem diferentes compostos e quantidade de acordo com a idade, fase solitária e gregária, virgindade e maturidade sexual (Trabalon et al., 1996; Papke et al., 2001; Gaskett, 2007). Se fêmeas de *M. cuspidatus* liberam químicos voláteis no período reprodutivo, por exemplo, talvez o olfato mais sensível de machos coespecíficos poderia facilitar a detecção de químicos de fêmeas à longa distância. Em Araneae, fêmeas comumente liberam compostos voláteis que atraem machos para copular (Gaskett, 2007; Papke et al., 2001; Kasumovic &

Andrade, 2004). Em Laniatores, é comum machos procurarem por fêmeas receptivas a cópula no ambiente (Munguía-Steyer et al., 2012). Sendo assim, o olfato mais sensível de machos de *M. cuspidatus* também poderia ajudá-los a encontrar as fêmeas no período reprodutivo, por exemplo. Pouco se sabe sobre o período exato de reprodução de *M. cuspidatus*, mas oviposições já foram observadas em janeiro e em fevereiro (Mestre & Pinto-da-Rocha, 2004). Nossos experimentos foram realizados entre os meses de setembro e dezembro. É, portanto, possível que os machos de *M. cuspidatus* não tenham sido atraídos por fêmeas coespecíficas porque elas não estavam liberando compostos voláteis talvez por não estarem no período de reprodução. Entretanto, vale a pena ressaltar que opiliões Laniatores tipicamente se reproduzem o ano todo mesmo que haja picos em alguns meses (Machado & Oliveira, 1998).

Dado que as fêmeas de *M. cuspidatus* possivelmente não estavam liberando químicos voláteis durante o experimento e que elas talvez não possuam o olfato tão sensível, o fato dos machos de *M. cuspidatus* exibirem preferência por machos coespecíficos não necessariamente está relacionado à preferência por machos, mas sim porque talvez fosse o único odor que machos detectaram naquele momento. O mesmo pode-se pensar para os dados de Harvey et al. (2017) em que somente machos foram atraídos ao ambiente de repouso de machos coespecíficos. Essa atração pode não ser uma consequência de machos preferirem o odor de outro macho, mas simplesmente porque eles foram os únicos a detectarem tal odor.

Os resultados do experimento de atração por abrigo não geram evidências de que machos de *M. cuspidatus* são atraídos à longa distância por químicos do próprio corpo e nem por químicos de coespecíficos do mesmo sexo previamente deixados no abrigo. Estes resultados sugerem que em vez de compostos voláteis, os indivíduos de *M. cuspidatus* podem deixar compostos pouco voláteis como hidrocarbonetos cuticulares nos abrigos, como observado em algumas baratas e joaninhas (Rivault & Cloarec, 1998; Durieux et al., 2012). Alguns estudos inclusive mostram evidências de hidrocarbonetos cuticulares sendo utilizados para o reconhecimento de abrigos (Lenoir et al., 2009; Rivault & Cloarec, 1998). Geralmente nesse caso, é necessário contato direto com o químico, diferentemente de químicos voláteis em que a detecção ocorre à distância. Caso os indivíduos de *M. cuspidatus* deixem hidrocarbonetos cuticulares nos abrigos, a detecção possivelmente seria por quimiorrecepção de contato e não à distância. Nessa

situação, o animal deixaria rastros por onde caminha, podendo voltar ao abrigo seguindo esses rastros químicos. De fato, Laniatores são comumente vistos raspando o corpo no substrato quando caminham (Fernandes & Willemart, 2014; Murayama & Willemart, 2015). Alternativamente, os indivíduos de *M. cuspidatus* poderiam ter detectado os próprios químicos voláteis e aqueles de coespecíficos do mesmo sexo deixados nos abrigos, mas simplesmente não optaram por abrigo marcado quimicamente. Finalmente, os indivíduos de *M. cuspidatus* poderiam simplesmente não deixar químicos nos abrigos, o que parece improvável. O comportamento de marcação química é vastamente documentado em Arthropoda (Wyatt, 2014) e em Opiliones há diversas evidências comportamentais que sugerem marcação química no ambiente (Willemart & Hebets, 2012; Fernandes & Willermart, 2014; Murayama & Willemart, 2015). Além disso, há evidências de químicos deixados nos ambientes por indivíduos de outra subordem em Opiliones (Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007).

Uma das perguntas sem respostas de retorno ao abrigo em Laniatores era se os indivíduos utilizam pistas químicas para reencontrar seu abrigo e se esses são químicos voláteis ou de contato. Nossos resultados apontam que machos de *M. cuspidatus* usam o olfato e são atraídos por químicos voláteis emitidos diretamente de machos coespecíficos, mas não são atraídos por químicos deixados previamente no abrigo. Considerando que o retorno ao ambiente de repouso também pode ocorrer por meio da atração por químicos emitidos diretamente de coespecíficos, o encontro de abrigos em *M. cuspidatus* pode acontecer por meio da atração inicial entre machos coespecíficos e talvez essa atração possa facilitar o início da formação gregária nessa espécie. Uma das hipóteses de formação gregária está relacionada à proteção contra predação (Holmberg et al., 1984; Machado et al., 2002; Machado & Macías-Ordóñez, 2007). Atrair coespecíficos do mesmo sexo pode aumentar o número de indivíduos no agregado e consequentemente contribuir com a proteção gregária. Grandes agregados, com grande quantidade de indivíduos, podem produzir um melhor efeito de diluição e confusão quando predados e assim minimizar as chances de ataques dos predadores (Machado et al., 2002). Dessa forma, seria vantajoso para machos de *M. cuspidatus* atrair machos coespecíficos à distância. Nesse cenário hipotético, a quantidade de machos no agregado pode contribuir com a concentração de químicos de coespecífico no ambiente de repouso e assim ajudar na atração de fêmeas à longa distância.

A olfação em Opiliones tradicionalmente não tem sido considerada uma modalidade sensorial importante, mas evidências têm mudado esse cenário (Machado et al., 2002; Willemart & Chelini, 2007; Costa & Willemart, 2013; Santos et al., 2013). Aqui reportamos pela primeira vez a olfação à longa distância (50 cm) demonstrada experimentalmente, adicionando aos dados morfológicos de Gainett et al. (2017) que detectaram inúmeros receptores olfativos nas pernas I e II de opiliões Laniatores. Consideramos que a olfação seja mais importante no comportamento de Opiliones do que anteriormente mencionado. Incentivamos que os futuros estudos em Opiliones considerem as possíveis implicações do olfato no comportamento desses animais.

5. Referência Bibliográfica

Ame, J-M., Rivault, C. & Deneubourg, J-L. (2004). Cockroach aggregation based on strain odour recognition. *Animal Behaviour* 68: 793–801.

Bartelt, R. J., Schaner, A. M. & Jackson, L. L. (1985). Cis-vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal Chemical Ecology* 11: 1747–1756.

Berger, J. (1978). Group size, foraging, and antipredator ploys: An analysis of bighorn sheep decisions. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 4: 91-99.

Butler, C. G., Fletcher, D. J. C. & Watler, D. (1969). Nest-entrance marking with pheromones by the honeybee *Apis mellifera* L., and by a wasp, *Vespula vulgaris* L. *Animal Behavior* 17: 142 -147.

Carr, A. L., Roe, R. M., Arellano, C., Sonenshine, D. E., Schal, C. & Apperson, C. S. (2013). Responses of *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* to odorants that attract haematophagous insects. *Medical and Veterinary Entomology* 27: 86–95.

Carr, A. L. & Roe, M. (2016). Acarine attractants: Chemoreception, bioassay, chemistry and control. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 131: 60–79.

Chelini, M-C., Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2011). Caves as a winter refuge by a neotropical harvestman (Arachnida, Opiliones). *Journal of Insect Behavior* 24:393–398.

Chelini, M-C., Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2012). Gregarious behavior of two species of Neotropical harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Arachnology* 40: 256-258.

Cornell, J. C., Stamp, N. E & Bowers, M. D. (1987). Developmental change in aggregation, defense and escape behavior of buckmoth caterpillars, *Hemileuca lucina* (Saturniidae). *Behavioral Ecology Sociobiology* 20: 383-388.

Costa, T. M. & Willemart, R. H. (2013). First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. *Zoologia* 30: 359-361.

Costa, T. M., Silva, N. F. S. & Willemart, R. H. (2016). Prey capture behavior in three neotropical armored harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Journal of Ethology* 34: 183-190.

Curtis, D. J. & Machado, G. (2007). Ecology. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard university press, Cambridge, MA, USA, pp. 290-308.

Dodson, G. N., Lang, P. L., Jones, R. N. & Versprille, A. N. (2013). Specificity of attraction to floral chemistry in *Misumenoides formosipes* crabspiders. *Journal of Arachnology* 41: 36-42.

Donaldson, Z. R. & Grether, G. F. (2007). Tradition without social learning: scent-mark-based communal roost formation in a neotropical harvestman (*Prionostemma* sp.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 801–809.

Durieux, D., Fischer, C., Brostaux, Y., Sloggett, J. J., Deneubourg, J-L., Vandereycken, A., Joie, E., Wathelet, J-P., Lognay, G., Haubruge, E. & Verheggen, F. J. (2012). Role of long-chain hydrocarbons in the aggregation behavior of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Insect Physiology* 58: 801–807.

Elias, D. O., Mason, A. C. & Hoy, R. R. (2004). The effect of substrate on the efficacy of seismic courtship signal transmission in the jumping spider *Habronattus dossenus* (Araneae: Salticidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 4105-4110.

Faustini, D. L., Giese W. L., Phillips J. K.. & Burkholder W. E. (1982). Aggregation pheromone of the male granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). *Journal of Chemical Ecology* 8: 679-687.

Fernandes, N. S. & Willemart, R. H. (2014). Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. *Comptes Rendus Biologies* 337: 269-275.

Fitzgerald, M. R. & Ives, A. R. (2017). Conspecific attraction drives intraspecific aggregations by *Nephila clavipes* spiders. *Ethology* 123: 51–60.

Gaskett, A. C. (2007). Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. *Biology Review* 82: 27–48.

Gainett, G., Michalik, P., Muller, C., Giribet, G., Talarico, G. & Willemart, R.H. (2017). Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). *Arthropod Structure & Development* 46: 178–195.

Giribet G. & Sharma P. P. (2015). Evolutionary biology of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Annual Review Entomology* 60: 157–75.

Gnaspini, P. (1996). Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Zoology* 239: 417-435.

Graves, B. M & Duvall, D. (1987). An experimental study of aggregation and thermoregulation in prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis viridis*). *Herpetologica* 43: 259-264.

Grether, G. F. & Donaldson, Z. R. (2007). Communal roost site selection in a neotropical harvestman: habitat limitation vs. tradition. *Ethology* 113: 290–300.

Grether, G. F., Aller, T. L., Grucky, N. K., Levi, A., Antaky, C. C. & Townsend, V. R. (2014). Species differences and geographic variation in the communal roosting behavior of *Prionostemma* harvestmen in Central American rainforests. *Journal of Arachnology* 42: 257-267.

Harvey, B. D., Vanni, K. N., Shier, D. M. & Grether, G. F. (2017). Experimental test of the mechanism underlying sexual segregation at communal roosts of harvestmen (*Prionostemma* spp.). *Ethology* 123: 516–525.

Hassanali, A., Njagi, P. G. N. & Bashir, M. O. (2005). Chemical ecology of locusts and related acridids. *Annual Review Entomology* 50: 223–45.

Hebets, E. A. (2004). Attention-altering signal interactions in the multimodal courtship display of the wolf spider *Schizocosa uetzi*. *Behavioral Ecology* 16: 75-82.

Hebets, E. A., Aceves-Aparicio, A., Aguilar-Argüello, S., Bingman, V. P., Escalante, I., Gering, E. J., Nelsen, D. R., Rivera, J., Sánchez-Ruiz, J. A., Segura-Hernández, L., Settepani, V., Wiegmann, D. D. & Stafstroma, J. A. (2014). Multimodal sensory reliance in the nocturnal homing of the amblypygid *Phrynus pseudoparvulus* (Class Arachnida, Order Amblypygi)? Behavioural Processes 108: 123–130.

Hebets, E. & Chapman, R. F. (2000). Electrophysiological studies of olfaction in the whip spider *Phrynus parvulus* (Arachnida, Amblypygi). Journal of Insect Physiology 46: 1441–1448.

Holmberg, R.G., Angerilli, N. P. D. & LaCasse, L. J. (1984). Overwintering aggregations of *Leiobunum paessleri* in caves and mines (Arachnida, Opiliones). The Journal of Arachnology 12: 195-204.

Hostettler, S. & Nentwig, W. (2006). Olfactory information saves venom during prey-capture of the hunting spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). Functional Ecology 20: 369–375.

Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1978). The multiple recruitment systems of the african weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille) (Hymenoptera: Formicidae). Behavioral Ecology and Sociobiology 3: 19-60.

Kasumovic, M. M. & Andrade, M. C. B. (2004). Discrimination of airborne pheromones by matesearching male western black widow spiders (*Latrodectus hesperus*): species- and populationspecific responses. Canadian Journal of Zoology 82: 1027–1034.

Klok, C. J. & Chown, S. L. (1999). Assessing the benefits of aggregation : thermal biology and water relations of anomalous emperor moth caterpillars. Ecology 13: 417-427.

Kury, A. B. (2017). Classification of Opiliones. Museu Nacional/ UFRJ Website. URL: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.

Lendrem, D. W. (1984). Sleeping and vigilance in birds, II. an experimental study of the barbary dove (*Streptopelia risoria*). Animal Behaviour 32: 243-248.

Lenoir, A., Depickère, S., Devers, S., Christidès, J-P. & Detrain, C. (2009). Hydrocarbons in the ant *Lasius niger*: From the cuticle to the nest and home range marking. *Journal Chemical Ecology* 35: 913–921.

Machado, G. & Oliveira, P. S. (1998). Reproductive biology of the neotropical harvestman (*Goniosoma longipes*) (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae): Mating and oviposition behaviour, brood mortality, and parental care. *Journal of Zoology* 246: 359–367.

Machado, G., Bonato, V. & Oliveira P.S. (2002). Alarm communication: A new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Naturwissenschaften* 89: 357–360.

Machado, G., Raimundo, R. L. G. & Oliveira, P. S. (2000). Daily activity schedule, gregariousness, and defensive behaviour in the neotropical harvestman *Goniosoma longipes* (Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Natural History* 34: 587–596.

Machado, G. & Macías-Ordoñez, R. (2007). Social Behavior. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 400-413.

Mestre, L. A. M. & Pinto-da-Rocha R. (2004). Population dynamics of an isolated population of the harvestman *Ilhaia cuspidata* (Opiliones, Gonyleptidae), in araucaria forest (Curitiba, Paraná, Brazil). *The Journal of Arachnology* 32: 208–220.

Munguía-Steyer, R., Buzatto, B. A. & Machado, G. (2012). Male dimorphism of a neotropical arachnid: harem size, sneaker opportunities, and gonadal investment. *Behavioral Ecology* 23: 827-835.

Murayama, G. P. & Willemart, R. H. (2015). Mode of use of sexually dimorphic glands in a neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. *Journal of Natural History* 49: 1937-1947.

Nelson, X. J., Warui, C. M. & Jackson, R. R. (2012). Widespread reliance on olfactory sex and species identification by lysomanine and spartaeine jumping spiders. *Biological Journal of the Linnean Society* 107: 664–677.

Onzo, A., Hanna, R. & Sabelis, M. W. (2012). The predatory mite *Typhlodromalus aripo* prefers green-mite induced plant odours from pubescent cassava varieties. *Experimental and Applied Acarology* 58: 359–370.

Papke, M. D., Riechert, S. E. & Schulz, S. (2001). An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. *Animal Behaviour* 61: 877–886.

Parrish, J. K., Viscido, S. V. & Nbaum, D. G. (2002). Self-Organized fish schools: An examination of emergent properties. *The Biological Bulletin* 202: 296–305.

Pereira, W., Elpino-Campos, A., Del-Claro, K. & Machado, G. (2004). Behavioral repertory of the neotropical harvestman *Ilhaia cuspidata* (Opiliones, Gonyleptidae). *The Journal of Arachnology* 32: 22–30.

Polis, G. A. (1990). *The Biology of Scorpions*. Ed. Stanford University Press, Stanford, CA, USA, pp. 130-168.

Rayor, L. S. & Taylor, L. A. (2006). Social behavior in amblypygids, and a reassessment of arachnid social patterns. *The Journal of Arachnology* 34:399–421.

Rivault, C. & Cloarec, A. (1998). Cockroach aggregation: discrimination between strain odours in *Blattella germanica*. *Animal Behaviour* 55: 177–184.

Romey, W. L. & Wallace, A. C. (2007). Sex and the selfish herd: sexual segregation within nonmating whirligig groups. *Behavioral Ecology* 18: 910-915.

Rottler, A-M., Schulz, S. & Ayasse, M. (2013). Wax lipids signal nest identity in bumblebee colonies. *Journal Chemical Ecology* 39: 67–75.

Santer, R. D. & Hebets, E. (2011). The sensory and behavioural biology of whip spiders (Arachnida, Amblypygi). *Advances in Insect Physiology* 41: 1-64.

Santos, G. C., Hogan, J. A. & Willemart, R. H. (2013). Associative learning in a harvestman (Arachnida, Opiliones). *Behavioural Processes* 100: 64–66.

Silva, R., Walter, G. H., Wilson, L. J. & Furlong, M. J. (2014). Responses of *Thrips tabaci* to odours of herbivore-induced cotton seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151: 239–246.

Sinclair, A. R. E. (1985). Does interspecific competition or predation shape the african ungulate community? *Journal of Animal Ecology* 54: 899-918.

Soares, S. F. & Borges, L. M. F. (2012). Electrophysiological responses of the olfactory receptors of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to host-related and tick pheromone-related synthetic compounds. *Acta Tropica* 124: 192– 198.

Trabalon, M., Bagnères, A. G., Hartmann, T. N. & Vallet, A. M. (1996). Changes in cuticular compounds composition during the gregarious period and after dispersal of the young in *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 77-84.

Teng, B., Dao, S., Donaldson, Z. R. & Grether, G. F. (2012). New communal roosting tradition established through experimental translocation in a neotropical harvestman. *Animal Behaviour* 84: 1183-1190.

Torto, B., Obeng-Ofori, D., Njagi, P. G. N., Hassanali, A. & Amiani, H. (1994). Aggregation pheromone system of adult gregarious desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) *Journal of Chemical Ecology* 20: 1749-1762.

Treves, A. (2000). Theory and method in studies of vigilance and aggregation. *Animal Behaviour* 60: 711–722.

Vanderbilt, C. F., Giblin-Davis, R. M. & Weissling, T. J. (1998). Mating behavior and sexual response to aggregation pheromone of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). *The Florida Entomologist* 81: 351-360.

Zhong, F., He, Y-R., Gao, Y., Qi, G-J., Zhao, G-Y. & Lu, L-H. (2011). Olfactory responses of *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) to odors of host plants and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)–plant complexes. *Arthropod-Plant Interactions* 5: 307–314.

Walsh, R. E. & Rayor, L. S. (2008). Kin discrimination in the amblypygid, *Damon diadema*. *Journal of Arachnology* 36: 336-343.

Warburg, M. R. (2000). Intra- and interspecific cohabitation of scorpions in the field and the effect of density, food, and shelter on their interactions. *Journal of Ethology* 18: 59-63.

Willemart, R. H. & Hebets, E. A. (2012). Sexual differences in the behavior of the harvestman *Leiobunum vittatum* (Opiliones, Sclerosomatidae) towards conspecific cues. *Journal of Insect Behavior* 25: 12-23.

Willemart, R. H. & Chelini, M. C. (2007). Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 73-79.

Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2004). Spatial distribution, mobility, gregariousness, and defensive behaviour in a Brazilian cave harvestman *Goniosoma albiscriptum* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *Animal Biology* 54: 221-235.

Willemart, R. H., Farine, J.-P. & Gnaspini, P. (2009). Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. *Acta Zoologica* 90: 209–227.

Wyatt, T. D. (2014). Pheromones and animal behaviour, communication by smell and taste. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-6; 37-41.

O opilião *Neosadocus maximus* (Arachnida: Opiliones) utiliza o olfato para retornar ao abrigo

Jéssica Morais Dias^{1,2} e Rodrigo Hirata Willemart^{1,2,3*}

¹ Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes, Escola de Artes Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*E-mail: willemart@usp.br

Palavras-chave: Opiliones, Laniatores, olfação, químico volátil, homing, abrigo.

Resumo

A marcação química é uma das maneiras utilizadas por animais para retornar a seu local de origem. Dado que várias espécies na ordem Opiliones retornam ao abrigo após forragear, que opiliões deixam químicos no substrato, que há evidência comportamental de olfato ao menos à curta distância, que há inúmeros receptores olfativos na subordem Laniatores e que fêmeas do opilião *Neosadocus maximus* (Laniatores: Gonyleptidae) desertam temporariamente mas retornam às suas próprias desovas, hipotetizamos que indivíduos de *N. maximus* utilizam o olfato para retornar aos seus abrigos, detectando os próprios químicos voláteis deixados previamente nos abrigos. Utilizamos o olfatômetro em formato de Y para testar nossa hipótese. Utilizamos como estímulos abrigos dos sujeitos experimentais e abrigos controle. Nossos resultados mostram que indivíduos de *N. maximus* escolhem significativamente mais o lado do olfatômetro com o abrigo próprio. Historicamente, Opiliones têm sido retratados como muito dependentes da quimiorrecepção de contato e aqui apresentamos dados de que talvez a olfação seja mais importante que anteriormente relatado nessa ordem.

Abstract

Chemical marking is one the behaviors used by animals to return to its original location. Because various species in the order Opiliones return to their shelter after foraging, harvestmen leave chemicals on the substrate, there is behavioral evidence of olfaction at least at close range, there are various olfactory receptors in the suborder Laniatores and that females of *Neosadocus maximus* (Laniatores: Gonyleptidae) temporarily desert but return to their egg batches, we hypothesized that individuals of *N. maximus* use olfaction to return to their shelters, using chemicals previously left on the shelter. We used the Y-shaped olfactometer to test our hypothesis. As stimuli, we used the shelters of the experimental subjects and a control shelter. Our results show that individuals of *N. maximus* chose significantly more the side of the olfactometer with the its own shelter. Historically, Opiliones have been portrayed as very dependent on contact chemoreception, but here we provide evidence that olfaction is perhaps more important than previously thought.

1. Introdução

Ambientes marcados quimicamente têm sido documentados em vários contextos e em diferentes taxa (Wyatt, 2014). Os sinais químicos podem ser deixados no ambiente por meio do depósito de urina, fezes ou por raspagem de regiões glandulares contra o substrato (Wyatt, 2014). Os químicos deixados no ambiente podem facilitar a localização de comida (Hölldobler et al., 1978), discriminação de colônia (Rottler et al., 2013) e de indivíduos aparentados (Waldman & Bishop, 2004), a atração de parceiro sexual (Thomas, 2011) e o retorno ao ambiente de repouso (Hölldobler & Wilson, 1978).

A ordem Opiliones é a terceira maior ordem em Arachnida com 6.653 espécies descritas em quatro subordens viventes: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi e Laniatores (Giribet & Sharma, 2015; Kury, 2017). Opiliões têm sido tradicionalmente relatados como muito dependentes da quimiorrecepção de contato nos contextos de detecção de alimentos, predadores e parceiros sexuais (Willemart et al., 2009). Mas sabemos também que o olfato ao menos à curta distância pode ser importante em Laniatores (Machado et al., 2002; Willemart & Chelini, 2007; Costa & Willemart, 2013; Santos et al., 2013). Recentemente, uma grande diversidade de receptores olfativos foi descrita na subordem Laniatores (Gainett et al., 2017), apoiando ainda mais a ideia de que olfação deve ser importante no grupo.

Químicos deixados no ambiente têm sido sugeridos como possíveis mediadores de atração de coespecíficos e de retorno ao abrigo em Opiliones (Gnaspini, 1996; Fernandes & Willemart, 2014; Murayama & Willemart, 2015). O comportamento que sugere marcação química, a raspagem de partes do corpo no substrato, tem sido observado nas subordens Eupnoi e Laniatores (Willemart et al., 2007; Donaldson & Grether, 2007; Willemart & Hebets, 2012; Fernandes & Willemart, 2014; Murayama & Willemart, 2015). Em Eupnoi, há evidências do uso de químicos de coespecíficos no retorno ao ambiente de repouso (Donaldson & Grether, 2007; Grether & Donaldson, 2007; Teng et al., 2012). Em Laniatores o retorno ao próprio abrigo tem sido observado em muitas espécies logo após o forrageio (Gnaspini, 1996; Machado et al., 2000; Willemart & Gnaspini, 2004b), mas até o momento não sabemos quais pistas esses animais utilizam.

No opilião *Neosadocus maximus* (Gonyleptidae) fêmeas exibem o comportamento de cuidado parental e tipicamente depositam seus ovos na região abaxial das folhas da vegetação ou em tocas no substrato (Machado et al., 2004; Chelini & Machado, 2011). As fêmeas de *N. maximus* cuidam de suas desovas durante a noite e, diferentemente de algumas outras espécies que exibem o comportamento de cuidado parental (ver Machado & Macías-Ordóñez, 2007), abandonam temporariamente seus ovos durante alguns momentos durante a noite e dia para forragear (Chelini & Machado, 2011, 2012). Já foram observadas fêmeas de *N. maximus* a 1,5 metros de distância de suas desovas (Chelini & Machado, 2012). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar porque fêmeas de *N. maximus* abandonam temporariamente suas desovas (ver Chelini & Machado, 2012), e até o momento nada se sabe sobre as pistas que essas fêmeas utilizam para retornar aos seus ovos após o forrageio. Sendo assim, considerando que fêmeas de *N. maximus* retornam às suas próprias desovas, que ambos os sexos em várias espécies retornam ao abrigo após forragear, que opiliões deixam químicos no substrato, que há evidência comportamental de olfato ao menos à curta distância e que há inúmeros receptores olfativos em Laniatores, hipotetizamos que indivíduos de *N. maximus* retornam aos seus abrigos por meio do uso do olfato na detecção dos próprios químicos voláteis deixados previamente nos abrigos.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e manutenção no laboratório

Coletamos manualmente 50 machos e 50 fêmeas de *N. maximus* no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), localizado no sudoeste do estado de São Paulo – Brasil, em novembro de 2015, nas trilhas da Represa, do Forno e do Braço do Rio Taquaral. Mantivemos os opiliões individualmente no laboratório, em recipiente de plástico transparente (diâmetro 20 cm x altura 8 cm), com terra vegetal umedecida, abrigo e algodão umedecido. Alimentamos os animais uma vez por semana com banana nanica (*Musa* spp.).

2.2. Ensaios comportamentais

Utilizamos um olfâmetro (chamado daqui pra frente de “Y”) de vidro transparente em formato de Y (Fig. 1). Nas três extremidades do Y havia terminais, chamados aqui de A, B e C (Fig. 1A; 1B; 1C) com intuito de impedir a saída do sujeito experimental e permitir a entrada e saída de ar de dentro do olfâmetro. Nos terminais A e B conectamos com mangueira de silicone potes hermeticamente fechados (Fig. 1D) cada. Colocamos os estímulos dentro desses potes juntamente com um pedaço de papel filtro (5 x 3 cm) umedecido para manter a umidade no interior dos potes e do Y. Também cobrimos esses potes com uma folha de EVA preta para impedir qualquer influência de pistas visuais dos estímulos ao sujeito experimental durante a escolha do braço do Y. Colocamos os sujeitos experimentais dentro do terminal C no próprio Y. Uma rede de Nylon impedia o deslocamento do sujeito experimental no Y durante o período de aclimatização (3 min). Após esse tempo, retiramos vagarosamente a rede de Nylon para permitir o acesso do sujeito experimental aos braços do Y. O tempo máximo de cada teste foi de 20 min e consideramos como escolha o braço em que o sujeito experimental entrou primeiro com o corpo inteiro.

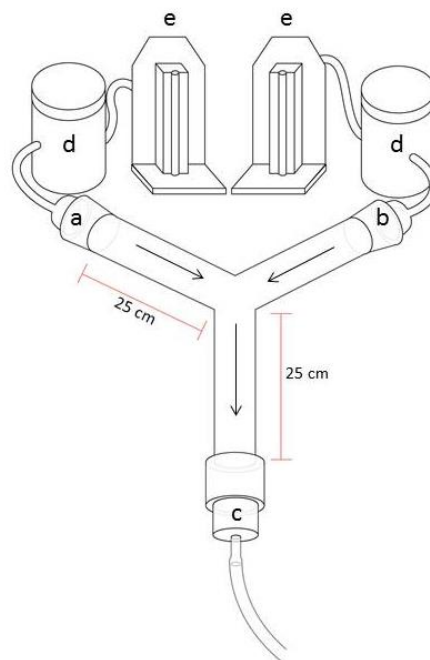


Figura 1. Representação do olfâmetro de vidro transparente em formato de Y, com os terminais de vidro (A, B e C) conectados nas extremidades. Os sujeitos experimentais eram aclimatizados por 3 min no terminal 1C. Os potes hermeticamente fechados (D) conectados por mangueiras de silicone aos terminais e aos fluxímetros de ar (E). As setas indicam a direção unilateral do ar.

O ar que passava dentro do Y foi sugado pela bomba de ar (Primatec – Bombas de vácuo) e previamente filtrado pelo carvão ativado (Trigon Technologies). Dois fluxímetros de ar (Fig. 1E) (Ki Key Instrumentos), cada um conectado aos potes de vidro hermeticamente fechados, controlava a velocidade do fluxo do ar dentro do Y. Direcionamos todo o ar que passava dentro do Y para fora da sala de testes por meio de uma mangueira de silicone para minimizar as chances de esse ar ser reutilizado novamente em outros testes. Colocamos a bomba de ar sob um isopor (espessura 4,5 cm) e uma placa de granito (espessura 2 cm), que diminui a dispersão da vibração (Elias et al., 2004; Hebets, 2004), com o intuito de minimizar a influência de vibrações da sala. Adicionalmente, colocamos o Y sobre uma folha de EVA e uma mesa de granito. Também montamos barreiras nas laterais e parte superior (Fig. 2) do Y para minimizar interferências de pistas visuais do ambiente ao sujeito experimental durante a escolha do braço do Y. Após cada teste limpamos o Y, os terminais, os potes de vidro e as mangueiras de silicone com álcool 70%. Realizamos os experimentos entre 20h00 e 00h00 nos meses de janeiro a março de 2016. A média de temperatura e umidade foram, respectivamente, de 25°C (min: 22,7°C; máx: 27,1°C; desv pad = 1,2; n = 14) e 74% (min: 63,5%; máx: 86%; desv pad = 6,7 n = 14). Utilizamos o teste Qui-quadrado para a análise estatística que compara as escolhas dos sujeitos experimentais com o resultado esperado de 50% para cada braço do Y. Realizamos a análise separadamente para cada combinação.

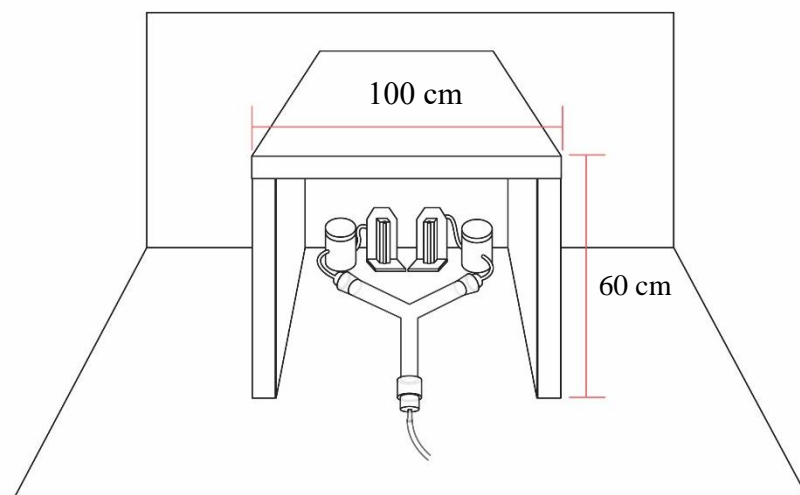


Figura 2. Representação da barreira de isopor preto nas laterais e parte superior do olfátometro.

2.3. Experimento: Atração por abrigo

Aqui testamos se fêmeas e machos de *N. maximus* são atraídos pelo próprio químico volátil deixado previamente no abrigo. Utilizamos gomos de caixas de ovos de papelão como abrigos dos indivíduos (chamado daqui pra frente de abrigo próprio) e controle. Mantivemos o abrigo próprio dentro dos terrários dos sujeitos experimentais e o abrigo controle dentro de um terrário idêntico, mas sem opilião. Ambos os abrigos permaneceram nos terrários durante 30 dias.

Separamos o experimento em três combinações com os seguintes estímulos: (1) abrigo próprio X abrigo controle; (2) abrigo próprio X papel filtro umedecido; (3) abrigo controle X papel filtro umedecido. Prevemos que os sujeitos experimentais escolham o braço do Y com o “abrigo próprio” nas combinações (1) e (2) e 50% para cada braço do Y na combinação (3). Fizemos as análises em cada combinação com o agrupamento de ambos os sexos, pois não houve diferença significativa entre os sexos na escolha pelos tratamentos ($P > 0,05$). Testamos cada indivíduo uma única vez em cada uma das combinações.

3. Resultados

3.1. Experimento: Atração por abrigo

Os sujeitos experimentais escolheram significativamente o braço com abrigo próprio tanto quando ele foi combinado com abrigo controle quanto com papel filtro umedecido (tabela 1).

Tabela 1: Escolhas feitas pelo opilião *Neosadocus maximus* frente a diferentes combinações de estímulos em um olfatômetro em Y ($n = 17$; $GL = 1$).

| Combinação | Estímulos | Número de escolhas | χ^2 | P |
|------------|------------------------|--------------------|----------|------|
| 1 | Abrigo próprio | 13 | 4,76 | 0,03 |
| | Abrigo controle | 4 | | |
| 2 | Abrigo próprio | 13 | 4,76 | 0,03 |
| | Papel filtro umedecido | 4 | | |
| 3 | Abrigo controle | 9 | 0,059 | 0,80 |
| | Papel filtro umedecido | 8 | | |

3.2. Comportamento dos animais no Y

Os sujeitos experimentais ficaram com as pernas I e II esticadas à frente do corpo com movimentos dorsoventrais durante o deslocamento. Na bifurcação do Y (ver figura 1), alguns indivíduos direcionaram as pernas I e II com movimento dorsoventral para os braços com os estímulos e outros entraram direto no braço escolhido sem direcionar as pernas para o braço oposto do Y. No final de cada braço escolhido, os indivíduos exploraram a região tateando a parede interna do Y com as pernas I e II. Durante todo o teste os sujeitos experimentais limpavam constantemente as pernas I e II passando-as na boca.

4. Discussão

Indivíduos de *N. maximus* escolheram significativamente mais o lado do Y com o próprio abrigo. Nossos resultados sugerem que indivíduos de *N. maximus* deixam químicos voláteis nos abrigos e que posteriormente são atraídos à longa distância (50 cm) por esses químicos por meio do olfato.

Há duas possibilidades sobre a maneira de deposição de químicos no substrato. Os químicos podem ser depositados passivamente conforme o animal se desloca sobre o abrigo, a exemplo do que aparentemente ocorre em *Scorpiones* e *Acari*, que podem

deixar químicos no substrato ao caminharem (Gaffin & Brownell, 2001; Zemek et al., 2007). Durante os momentos de manutenção dos terrários, observamos os indivíduos de *N. maximus* em postura de repouso no interior e sobre os abrigos, o que sugere que esses indivíduos se deslocaram no abrigo. Além disso, na postura de repouso os indivíduos permanecem com a região ventral do corpo em contato com o abrigo. O fato do corpo desses indivíduos terem tocado o abrigo também poderia ter contribuído para ter deixado químico na região. Químicos do corpo deixados em abrigos podem ser hidrocarbonetos cuticulares pouco voláteis. Esses químicos são comumente detectados por meio da quimiorrecepção de contato, mas também podem ser detectados à distância (Blomquist & Bagnères, 2010; Ozaki & Wada-Katsumata, 2010). Em insetos, há evidências de que alguns compostos cuticulares podem desencadear respostas neuronais em sensilla olfativas (Ozaki & Wada-Katsumata, 2010). Outra possibilidade não excludente é a deposição ativa por meio do comportamento de esfregar partes do corpo contra o substrato, o abrigo nesse caso. Muitas espécies de opiliões já foram observadas exibindo esse comportamento em cativeiro e também na natureza (Grether & Donaldson, 2007; Fernandes & Willemart, 2014; Murayama & Willemart, 2015) e *Neosadocus maximus* já foi observado esfregando as pernas contra o substrato (Willemart et al., 2007). Vale ressaltar que sabemos que esses animais são atraídos à longa distância por químico próprio, mas não sabemos se são atraídos à longa distância também por químicos de coespecíficos visto que não utilizamos estes últimos nos experimentos.

Durante os testes os indivíduos de *N. maximus* permaneceram com as pernas I e II esticadas realizando movimentos dorsoventrais à frente do corpo e na bifurcação do Y direcionavam essas pernas aos braços com os estímulos do Y. Sabe-se que insetos direcionam suas antenas que têm sensilla olfativas à fonte de odor (Böröczky et al., 2013; Willis & Avondet, 2005). Opiliões, já foram observados direcionando os primeiros pares de pernas, que também têm sensilla olfativas, à presa antes de capturá-las (Costa et al., 2016; Gainett et al., 2017). Adicionalmente, insetos limpam as antenas passando as na boca e há evidências que a limpeza das antenas desobstrui os poros das sensilla olfativas e mantém a acuidade olfativa. A ausência da limpeza das antenas em baratas pode comprometer a capacidade olfativa (Böröczky et al., 2013). O mesmo pode ocorrer com *N. maximus*, visto que eles passaram as pernas I e II constantemente na boca, comportamento que sugere limpeza das pernas (Hillyard & Sankey, 1989). Dessa

forma, ambas as pernas parecem ser importantes na detecção de odores, corroborando os dados morfológicos de que as pernas I e II são similares em termos de qualidade e quantidade de sensilla olfativas (Gainett et al., 2017).

De maneira geral, o olfato tem sido considerado importante durante o retorno ao ambiente de repouso em vertebrados e invertebrados (Vertebrados: Madison, 1972; Tristram, 1977; Wallraff, 2004; Invertebrados: Steck, 2012; Rottler et al., 2013; Hebets et al., 2014). Durante o retorno a um lugar conhecido os animais podem usar pistas olfativas do ambiente durante o seu deslocamento (Buehlmann et al., 2015; Gagliardo et al., 2016). Aqui apresentamos pela primeira vez evidências de que opiliões podem usar o olfato para retornar ao seu abrigo. Os resultados mostram o uso do olfato à longa distância na atração por químicos próprios voláteis deixados no ambiente. Esses animais também podem associar pistas químicas voláteis do ambiente para encontrar o abrigo (Santos et al., 2013). Talvez a associação de químicos voláteis próprios e ambientais seja importante na orientação de Opiliones pelo ambiente. Finalmente, abre-se a possibilidade, com este trabalho e o de Gainett et al. (2017), de que o olfato tenha sido subestimado no grupo e que possa ser importante em inúmeros contextos.

5. Referências Bibliográficas

Blomquist G. J. & Bagnères A. G. (2010). Introduction: History and Overview of Insect Hydrocarbons. In Blomquist, G. J. & Bagnères, A. G. (Eds). Insect Hydrocarbons. Cambridge University Press, Cambridge. pp 3-18.

Buehlmann, C., Graham, P., Hansson, B. S. & Knaden, M. (2015). Desert ants use olfactory scenes for navigation. *Animal Behaviour* 106: 99-105.

Böröczkya, K., Wada-Katsumataa, A., Batchelorb, D., Zhukovskayac, M. & Schala, C. (2013). Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 3615–3620.

Chelini, M. C. & Machado, G. (2011). Cuidado maternal no opilião *Neosadocus maximus* (Arachnida: Opiliones). Tese (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chelini, M. C. & Machado, G. (2012). Costs and benefits of temporary brood desertion in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 1619–1627.

Costa, T. M. & Willemart, R. H. (2013). First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. *Zoologia* 30: 359-361.

Costa, T. M., Silva, N. F. S. & Willemart, R. H. (2016). Prey capture behavior in three Neotropical armored harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Journal of Ethology* 34: 183-190.

Donaldson, Z. R. & Grether, G. F. (2007). Tradition without social learning: scent-mark-based communal roost formation in a Neotropical harvestman (*Prionostemma* sp.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 801–809.

Elias, D. O., Mason, A. C. & Hoy, R. R. (2004). The effect of substrate on the efficacy of seismic courtship signal transmission in the jumping spider *Habronattus dossenus* (Araneae: Salticidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 4105-4110.

Fernandes, N. S. & Willemart, R. H. (2014). Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) use sexually dimorphic glands to spread chemicals in the environment. *Comptes Rendus Biologies* 337: 269-275.

Gaffin, D. D. & Brownell, P. H. (2001). Chemosensory behavior and physiology. In Brownell, P. H. & Polis, G. (Eds). *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, pp 185-187.

Gagliardo, A., Pollonara, E & Wikelski, M. (2016). Pigeon navigation: exposure to environmental odours prior to release is sufficient for homeward orientation, but not for homing. *Journal of Experimental Biology* 219: 2475-2480.

Gainett, G., Michalik, P., Muller, C., Giribet, G., Talarico, G. & Willemart, R. H. (2017). Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). *Arthropod Structure & Development* 46: 178–195.

Giribet, G. & Sharma, P. P. (2015). Evolutionary biology of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Annual Review Entomology* 60: 157–75.

Gnaspini, P. (1996). Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Zoology* 239: 417-435.

Grether, G. F. & Donaldson, Z. R. (2007). Communal roost site selection in a neotropical harvestman: habitat limitation vs. tradition. *Ethology* 113: 290–300.

Hebets, E. A. (2004). Attention-altering signal interactions in the multimodal courtship display of the wolf spider *Schizocosa uetzi*. *Behavioral Ecology* 16: 75-82.

Hebets, E. A., Aceves-Aparicio, A., Aguilar-Argüello, S., Bingman, V. P., Escalante, I., Gering, E. J., Nelsen, D. R., Rivera, J., Sánchez-Ruiz, J. A., Segura-Hernández, L., Settepani, V., Wiegmann, D. D. & Stafstrom, J. A. (2014). Multimodal sensory reliance in the nocturnal homing of the amblypygid *Phrynus pseudoparvulus* (Class Arachnida, Order Amblypygi)? *Behavioural Processes* 108: 123–130.

Hillyard, P. D. & Sankey, J. H. P. (1989). Harvestman. *Synopses of the British fauna, new series*. Linnean Society of London 4: 1–119.

Hölldobler, B., Stanton, R. C. & Markl, H. (1978). Recruitment and food-retrieving behavior in *Novomessor* (Formicidae, Hymenoptera). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 4: 163-181.

Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1978). The Multiple Recruitment Systems of the African Weaver Ant *Oecophylla longinoda* (Latreille) (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 3: 19-60.

Kury, A. B. (2017). Classification of Opiliones. Museu Nacional/ UFRJ Website. URL: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.

Machado, G., Bonato, V. & Oliveira P. S. (2002). Alarm communication: A new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Naturwissenschaften* 89: 357–360.

Machado, G., Raimundo, R. L. G. & Oliveira, P. S. (2000). Daily activity schedule, gregariousness, and defensive behaviour in the neotropical harvestman *Goniosoma longipes* (Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Natural History* 34: 587–596.

Machado, G., Requena, G. S., Buzatto, B. A., Osses, F. & Rosseto, L. M. (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: 1-22.

Machado, G. & Macías-Ordoñez, R. (2007). Social behavior. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 400-413.

Madison, D. M. (1972). Homing orientation in salamanders: a mechanism involving chemical cues. *NASA Washington Animal Orientation and Navigation* p 485-498.

Murayama, G. P. & Willemart, R. H. (2015). Mode of use of sexually dimorphic glands in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones) with paternal care. *Journal of Natural History* 49: 1937-1947.

Ozaki, M. & Wada-Katsumata, A. (2010). Perception and Olfaction of Cuticular

Compounds. In Blomquist, G. J. & Bagnères, A. G. (Eds). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 207-221.

Rottler, A-M., Schulz, S. & Ayasse, M. (2013). Wax lipids signal nest identity in bumblebee colonies. *Journal Chemical Ecology* 39:67–75.

Santos, G. C., Hogan, J. A. & Willemart, R. H. (2013). Associative learning in a harvestman (Arachnida, Opiliones). *Behavioural Processes* 100: 64–66.

Steck, K. (2012). Just follow your nose: homing by olfactory cues in ants. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 231–235.

Teng, B., Dao, S., Donaldson, Z. R. & Grether, G. F. (2012). New communal roosting tradition established through experimental translocation in a Neotropical harvestman. *Animal Behaviour* 84: 1183-1190.

Thomas, M. L. (2011). Detection of female mating status using chemical signals and cues. *Biological Reviews* 86: 1–13.

Tristram, D. A. (1977). Intraspecific olfactory communication in the terrestrial salamander *Plethodon cinereus*. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1977: 597-600.

Zemek, R., Bouman, A. E. P. & Dusbábek, F. (2007). The influence of conspecific chemical cues on walking behavior of *Ixodes ricinus* males. *Experimental and Applied Acarology* 41: 255–265.

Waldman, B. & Bishop, P. J. (2004). Chemical communication in an archaic anuran amphibian. *Behavioral Ecology* 15: 88–93.

Wallraff, H. G. (2004). Avian olfactory navigation: Its empirical foundation and conceptual state. *Animal Behaviour* 67: 189-204.

Willemart, R. H. (2007). Rearing and maintenance of animals in captivity. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 520-524.

Willemart, R. H., Chelini, M. C., Andrade, R. & Gnaspini, P. (2007). An ethological approach to a SEM survey on sensory structures and tegumental gland openings of two neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *Italian Journal of Zoology* 74: 39-54.

Willemart, R. H. & Hebets, E. A. (2012). Sexual differences in the behavior of the harvestman *Leiobunum vittatum* (Opiliones, Sclerosomatidae) towards conspecific cues. *Journal of Insect Behavior* 25: 12-23.

Willemart, R. H. & Chelini, M. C. (2007). Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 73-79.

Willemart, R. H. & Gnaspini, P. (2004b). Spatial distribution, mobility, gregariousness, and defensive behaviour in a Brazilian cave harvestman *Goniosoma albiscriptum* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *Animal Biology* 54: 221-235.

Willemart, R. H., Farine, J.-P. & Gnaspini, P. (2009). Sensory biology of phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. *Acta Zoologica* 90: 209–227.

Willis, M. A. & Avondet, J. L. (2005). Odor-modulated orientation in walking male cockroaches *Periplaneta americana*, and the effects of odor plumes of different structure. *The Journal of Experimental Biology* 208: 721-735.

Wyatt, T. D. (2014). Pheromones and animal behaviour, communication by smell and taste. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-6; 37-41.

Efeito do jejum no olfato do opilião *Mischonyx cuspidatus* (Arachnida: Opiliones: Laniatores)

Jéssica Morais Dias^{1,2} e Rodrigo Hirata Willemart^{1,2,3*}

¹ Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes, Escola de Artes Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*E-mail: willemart@usp.br

Palavras-chave: Privação de alimento, sensibilidade olfativa, dimorfismo sexual.

Resumo

O jejum pode influenciar o comportamento animal em diversos contextos, podendo por vezes aumentar a sensibilidade olfativa nos animais. Entretanto, esse é um assunto pouco explorado em Arachnida. Opiliones têm sido historicamente retratados como muito dependentes da quimiorrecepção de contato. Recentemente, uma grande diversidade de receptores olfativos foi descrita em Laniatores e o uso do olfato a curta distância (< 2 cm) já foi documentado no contexto de alimentação. Utilizamos *Mischonyx cuspidatus* (Gonyleptidae) para testar o efeito do jejum na sensibilidade olfativa. Utilizamos um olfatômetro em formato de Y e como estímulo banana nanica (*Musa* spp.). Testamos os animais após uma e três semanas de jejum. Machos foram atraídos significativamente mais para o lado do olfatômetro com odor de banana somente na terceira semana em jejum. Fêmeas não mostraram preferência por nenhum estímulo em nenhuma situação de jejum. Nossos resultados sugerem que há alteração na sensibilidade olfativa de machos, cujo olfato parece ficar mais sensível após jejum de três semanas. Essa alteração na sensibilidade olfativa de machos pode ser devido às alterações na recepção e/ou transporte de moléculas odoríferas até receptores olfativos dentro das sensilla olfativas. As fêmeas parecem não ter um olfato tão sensível quanto o dos machos. Essa diferença sexual no olfato dos indivíduos de *M. cuspidatus* no contexto alimentar pode ser resultado de exaptação a partir da seleção sexual. Esse é o primeiro trabalho que mostra o efeito do jejum no uso do olfato em Arachnida.

Abstract

Fasting can influence animal behavior in various contexts, sometimes increasing olfactory sensitivity. However, this is a poorly investigated subject in Arachnida. Opiliones have been historically portrayed as very dependent on contact chemoreception. Recently, a wide diversity of olfactory receptors have been described in Laniatores and the use of short range olfaction (< 2 cm) has been documented in foraging. We used *Mischonyx cuspidatus* (Gonyleptidae) to test the effect of fasting on olfactory sensitivity. We used a Y shaped olfactometer, banana (*Musa* spp.) as stimuli and we tested the animals after one and three weeks of starvation. Males were significantly attracted to the stimulus only after three weeks. Females did not show preference in neither starvation regime. Our results suggest that males become more

sensitive after a long fasting period. This may be a result of alterations in the reception/transportation of odorant molecules in the olfactory sensilla. Females seem to be less sensitive than males. This sexual difference in a foraging context may be a result of an exaptation of a function driven by primarily by sexual selection. This is, as far as we know, the first demonstration of fasting effects on olfactory sensitivity in arachnids.

1. Introdução

A privação de alimento pode ter uma série de consequências que influenciam o comportamento de um animal em diversos contextos. No caso do forrageio, pode levá-lo a se locomover com maior frequência no ambiente (Walker et al., 1999), detectar a presa em menor tempo (Persons, 1999), obter maior sucesso na disputa com coespecífico por presa (Nosil, 2002), capturar a presa mais rápido (Croy & Hugles, 1991) e ingerir maior quantidade de alimento (Junnian et al., 2007).

O jejum também pode influenciar os animais sensorialmente. Em vertebrados, há evidências de que a sensibilidade olfativa aumenta durante o jejum em seres humanos e ratos (Aimé et al., 2007; Stafford & Welbeck 2011; Ulusoy et al., 2016). Em invertebrados, insetos que usam pistas olfativas para encontrar a presa têm maior sensibilidade olfativa quando estão em jejum (Besouro: McIntyre & Vaughn, 1997; Mosca: Farhadian et al., 2012; Barbeiro: Reisenman et al., 2013; Reisenman, 2014). Em aracnídeos, até onde sabemos não há evidências de alteração na sensibilidade olfativa durante o jejum, mesmo que algumas espécies possam usar o olfato para detectar presas. Algumas aranhas usam o olfato para escolher presas (Cross & Jackson, 2011, 2014) e alguns ácaros são atraídos às substâncias voláteis induzidas por herbívoros em plantas para localizar a presa (Onzo et al., 2009, 2012). Em opiliões, há evidências do uso do olfato a curta distância na detecção de presa (Willemart & Chelini, 2007; Costa & Willemart, 2013; Costa et al., 2016a). Estes animais, portanto, se prestam para a investigação do possível efeito de jejum em comportamento de forrageio no que diz respeito especificamente à olfação.

Opiliones é a terceira maior ordem em aracnídeos com 6.653 espécies descritas em quatro subordens viventes: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi e Laniatores (Giribet & Sharma, 2015; Kury, 2017). São animais onívoros e costumemente forrageiam no período noturno sobre solo, rochas e vegetação (Gnaspini, 1996; Acosta & Machado, 2007). Como opiliões parecem possuir baixa acuidade visual e baixa percepção mecânica a distância, a quimiorrecepção tem sido a modalidade sensorial mais invocada na detecção de presas, especialmente a quimiorrecepção de contato (Willemart et al., 2009). Recentemente, em Laniatores, o uso da olfação à curta distância foi documentado nos contextos de comunicação intraespecífica, aprendizagem associativa e

alimentação (Machado et al., 2002; Willemart & Chelini, 2007; Santos et al., 2013; Costa & Willemart, 2013). Opiliões detectam odores de grilo fresco e podre a curta distância (< 1cm) e antes da captura direcionam seus pares de pernas I e II às presas (Costa et al., 2016b). Adicionalmente nesses pares de pernas há uma grande diversidade de receptores olfativos (Gainett et al., 2017). Assim, uma vez que Laniatores usam o olfato na detecção de presas, esperamos que o tempo de jejum aumente a sensibilidade olfativa nesses animais como já foi observado em outros taxa. Portanto, investigamos se indivíduos de *Mischonyx cuspidatus* (Gonyleptidae) são atraídos por odores de alimento durante o jejum de tempo reduzido e de tempo prolongado.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e manutenção no laboratório

Coletamos manualmente 50 machos e 50 fêmeas de *M. cuspidatus* sob troncos no Parque Ecológico do Tietê (23° 29' 46" S, 46° 31' 10" W), na cidade de São Paulo – Brasil, em novembro de 2016. Mantivemos os opiliões no laboratório, individualmente em recipientes de plástico transparente (12 cm x 8 cm x altura 4 cm), com terra vegetal umedecida, abrigo e algodão umedecido. Durante 30 dias alimentamos os animais duas vezes por semana com banana nanica (*Musa* spp.).

2.2. Procedimentos experimentais

Usamos um olfatômetro de vidro transparente com formato de Y (Fig. 1) para testar nossa hipótese. Colocamos o olfatômetro sobre uma folha de EVA (espessura 0,5 cm) e uma mesa de granito que minimizar a influência de vibração provocada pela bomba de ar (Elias et al., 2004; Hebets, 2004). Nas três extremidades do olfatômetro havia terminais, chamados de A, B e C (Fig. 1A; 1B; 1C) de vidro transparentes que impediam a saída do animal e permitiam a entrada no fluxo de ar no olfatômetro. Os três terminais estavam conectados a mangueiras de silicone, sendo que as mangueiras dos terminais A e B estavam conectados aos potes de vidro hermeticamente fechados (Fig. 1D) (diâmetro 9 cm x altura 17 cm) e a mangueira do terminal C direcionava o ar de dentro do olfatômetro para fora da sala para evitar retro contaminação desse ar em outros testes. Colocamos os estímulos do experimento dentro dos potes hermeticamente

fechados que estavam cobertos por uma folha de EVA preta para evitar qualquer interferência de pistas visuais na escolha do braço do olfatômetro pelo sujeito experimental. Com o mesmo objetivo construímos uma barreira de isopor coberto por EVA preto nas partes laterais e superior do olfatômetro (Fig. 2).

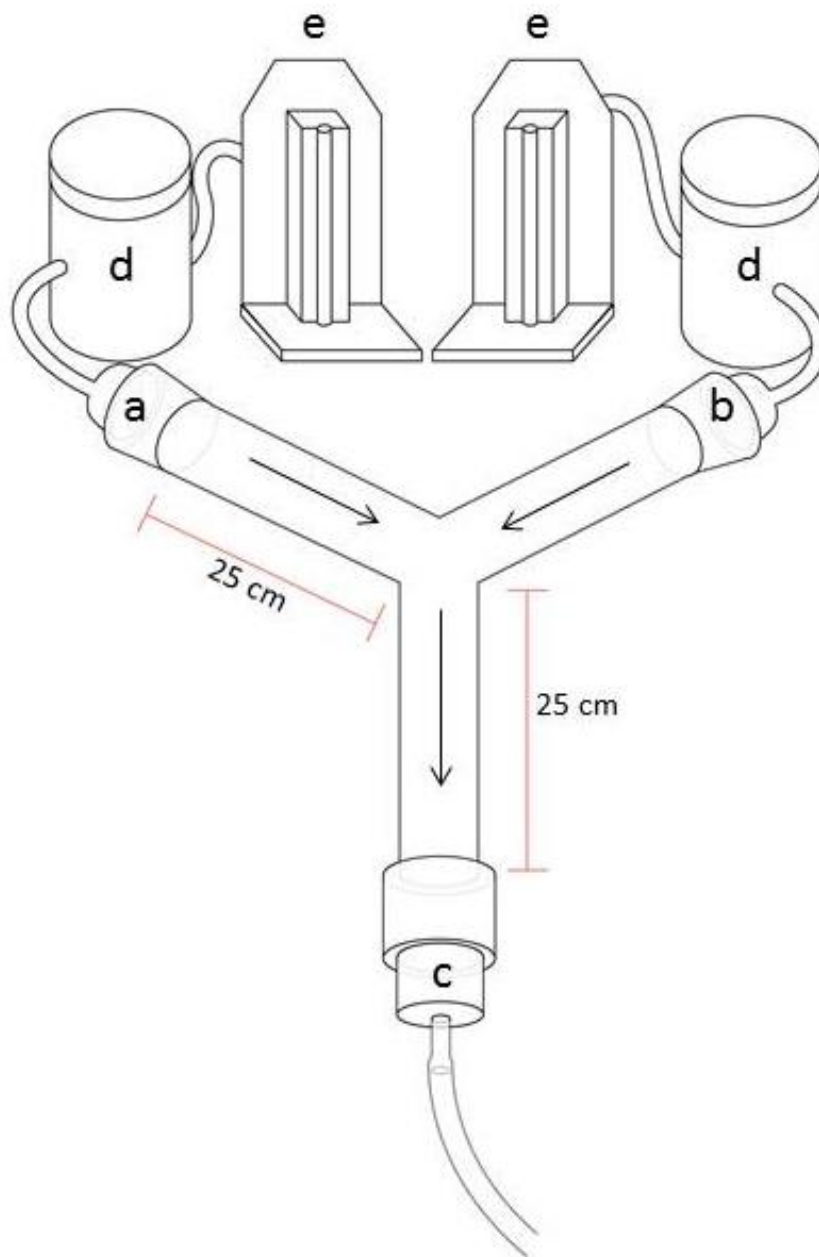


Figura 1. Representação do olfatômetro de vidro transparente em formato de Y, com os terminais de vidro (A, B e C) conectados nas extremidades. Os sujeitos experimentais eram aclimatizados por 3 min no terminal 1C. Os potes hermeticamente fechados (D) conectados por mangueiras de silicone aos terminais e aos fluxímetros de ar (E). As setas indicam a direção unilateral do ar.

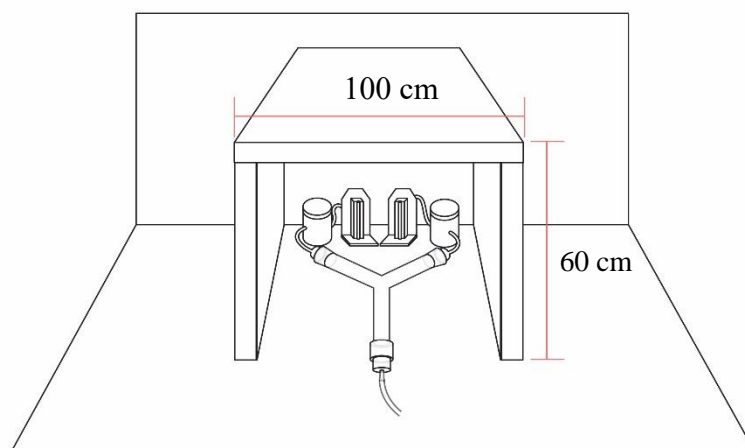


Figura 2. Representação da barreira de isopor preto nas laterais e parte superior do olfátometro.

Controlamos a velocidade do ar em 1 L/min por meio de dois fluxímetros (Fig. 1E) (Ki Key Instrumentos), cada um conectado aos potes hermeticamente fechados por meio de mangueiras de silicone. O ar introduzido no olfátometro foi filtrado por um carvão ativado (Trigon Technologies) e sugado no ambiente por uma bomba de ar a vácuo (Primatec – Bombas de vácuo). Colocamos essa bomba sobre uma placa de granito (espessura 2 cm) e isopor (espessura 4,5 cm) também com o intuito de minimizar o efeito de dispersão de vibração causado pela bomba. Aclimatizamos os sujeitos experimentais no terminal C do olfátometro por 3 min com o fluxo de ar unidirecional ativado (Fig. 1C). Após esse período, retiramos vagarosamente uma barreira de Nylon que impedia o deslocamento do sujeito experimento no olfátometro durante a aclimatização. Consideramos que um indivíduo escolheu um braço se ele o adentrou com o corpo inteiro. Limpamos o olfátometro, os terminais, os potes dos estímulos e as mangueiras de silicone com álcool 70% depois de cada teste. Realizamos os experimentos entre 20h00 e 00h00 nos meses de outubro e novembro de 2016. As médias de temperatura e umidade relativa no laboratório foram, respectivamente, de 21°C (min: 18°C; máx: 25°C; desv pad = 2,8; n = 7) e 80% (min: 70%; máx: 90%; desv pad = 6,0; n = 7). Utilizamos o teste Qui-quadrado para a análise estatística que compara as escolhas dos sujeitos experimentais com o resultado esperado de 50% para cada braço do Y. Realizamos a análise separadamente para cada combinação. Utilizamos o teste Qui-quadrado para a análise estatística que compara as escolhas dos sujeitos experimentais com o resultado esperado de 50% para cada braço do Y.

2.3. Preparo do estímulo odor de banana

Utilizamos bananas nanicas maduras como estímulo cujas cascas havia cerca de 20-40% de manchas escuras sobre um fundo amarelo. Dentro de um recipiente amassamos 8 centímetros de banana nanica com 50 mL de água (odor de banana). Posteriormente, submergimos um papel filtro (10 x 15 cm) nessa mistura por 5 segundos e o colocamos dentro de um dos potes hermeticamente fechados. Preparamos o odor de banana antes do início de cada teste. Utilizamos o odor de banana e o papel filtro uma única vez para cada teste. Como controle do experimento utilizamos um papel filtro (10 x 15 cm) umedecido por 5 segundos em água.

2.4. Experimento: atração por odor de banana

Neste experimento testamos se machos e fêmeas de *M. cuspidatus* em jejum de uma semana (tempo reduzido) e de três semanas (tempo prolongado) são atraídos à distância pelo odor da banana. Usamos a combinação banana x papel filtro umedecido para testar a nossa hipótese. Prevemos que os sujeitos experimentais escolheriam significativamente mais vezes o lado do olfatômetro com o estímulo banana. A cada teste, trocamos o lado do estímulo para minimizar eventual influência dos lados do olfatômetro na escolha dos sujeitos experimentais. Testamos os sujeitos experimentais apenas uma vez.

3. Resultados

3.1. Experimento: atração por odor de banana

Com uma semana de jejum, nem machos (n=7, 4 escolheram braço do Y com estímulo banana) ($\chi^2 = 0,1428$; GL = 1; $P > 0,50$) e nem fêmeas (n=7, 1 escolheu braço com estímulo banana) de *M. cuspidatus* escolheram significativamente um dos braços do olfatômetro ($\chi^2 = 3,571$; GL = 1; $P > 0,05$).

Após três semanas de jejum, machos de *M. cuspidatus* escolheram significativamente o lado do olfatômetro com banana ($\chi^2 = 8,909$; GL = 1; $P < 0,005$).

Em fêmeas não houve preferência por nenhum dos estímulos ($\chi^2 = 0,2857$; GL = 1; $P < 0,50$) (Fig. 3).

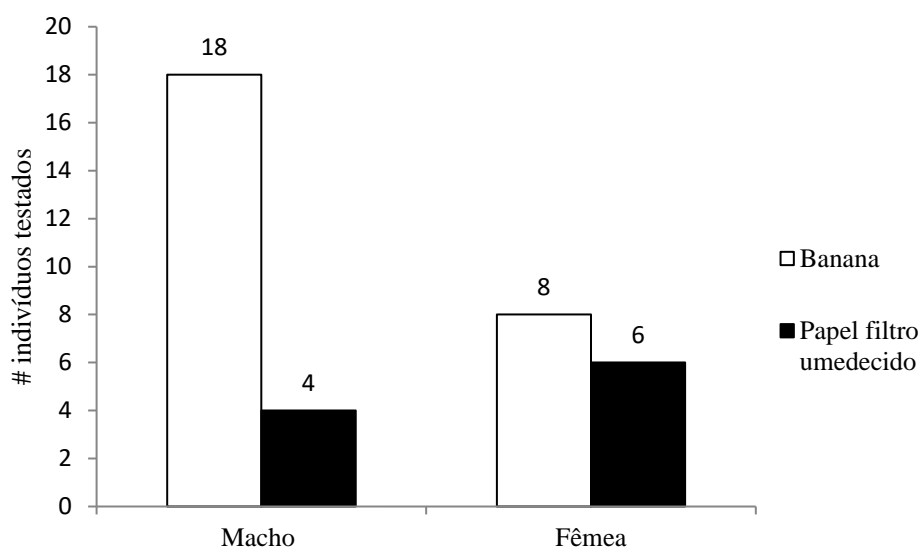


Figura 3. A atração por banana em machos e fêmeas do opilião *Mischonyx cuspidatus*, após jejum de três semanas.

3.2. Comportamento dos animais no olfatômetro

Durante os testes, os indivíduos de *M. cuspidatus* esticaram as pernas I e II à frente do corpo com movimentos dorsoventrais e laterolaterais. Algumas vezes tocaram as paredes do olfatômetro com as pernas I e II e/ou as passaram na boca.

4. Discussão

Nossos resultados evidenciam que o jejum afeta o comportamento de forrageio de machos do opilião *M. cuspidatus*. Enquanto que eles não se direcionam a um estímulo alimentar com uma semana de jejum, passam a fazê-lo após três semanas de jejum.

Em Arthropoda, moléculas odoríferas penetram os poros das sensilla olfativas e são conectados às proteínas de ligação de odor (PLO) que as transportam até os receptores olfativos e ativam a transdução do sinal (Brito et al., 2016). Em mariposas, as PLO na linfa das sensilla aumentam a intensidade de sinal transmitido e a sensibilidade dos receptores olfativos (Chang et al., 2015). Nesse caso, menos moléculas são transportadas aos receptores olfativos e não ocorre a ativação da transdução do sinal. De fato, após a alimentação esses indivíduos não são atraídos por odores de seu hospedeiro

(Takken et al., 2001). Nossos resultados comportamentais mostram que a sensibilidade olfativa em *M. cuspidatus* pode alterar conforme seu estado de fome. Após uma semana em jejum, os indivíduos de *M. cuspidatus* não foram atraídos pelo odor de banana, talvez porque tenha havido inibição ou diminuição da recepção e/ou transporte das moléculas odoríferas do alimento. Já no jejum de três semanas, em que machos foram atraídos por odor de banana, a recepção e o transporte dessas moléculas pelas PLO aos receptores olfativos poderia ter aumentado, levando a uma maior sensibilidade olfativa nesses opiliões.

Fêmeas de *M. cuspidatus* não se direcionam ao odor de banana em nenhuma situação de jejum (tempo reduzido ou prolongado). Esses resultados nos sugerem que talvez fêmeas de *M. cuspidatus* não possuam olfato tão sensível quanto o dos machos. Outra evidência para essa sugestão é que machos de *M. cuspidatus* são atraídos por odores de machos coespecíficos enquanto que as fêmeas não são atraídas (Dias & Willemart, dados não publicados). Diferenças sexuais no opilião *M. cuspidatus* já foram observados no comportamento de defesa de nipping e tanatose (Segovia et al. dados não publicados). Aqui apresentamos mais uma evidência de diferença sexual nessa espécie, agora em relação ao uso do olfato no contexto de alimentação. Diferenças sexuais no uso do olfato também foram documentadas em aranhas, em que fêmeas não são atraídas ao odor da planta que utilizam como abrigo enquanto que machos são (Dodson et al., 2013). Há indícios de que a atração de machos por odor de plantas em que as fêmeas se abrigam ocorre devido à tentativa dos machos em aumentar as chances de encontro com parceiras sexuais. Por nossos resultados mostrarem indícios de diferença sexual, o olfato mais sensível dos machos de *M. cuspidatus* para encontrar alimento pode ser resultado de exaptação a partir de seleção sexual. Machos de *M. cuspidatus* podem usar o olfato para encontrar fêmeas no ambiente quando essas liberaram químicos voláteis de atração de coespecífico (ver discussão do Capítulo 1). Em insetos, fêmeas comumente liberam químicos voláteis que atraem machos à distância (ver Cardé et al., 2008). O fato dos machos de *M. cuspidatus* terem olfato mais sensível que as fêmeas pode ajudá-los a encontrar fêmeas coespecíficas no ambiente e também pode ter contribuído para que machos detectem alimentos por meio do olfato.

Aqui apresentamos evidências comportamentais de que machos do opilião *M. cuspidatus* direcionam-se para um estímulo alimentar com três semanas de jejum, mas

não com apenas uma semana. A possibilidade de que machos passaram a ser atraídos pelo odor de alimento por razões exclusivamente motivacionais é improvável. Em laboratório, opiliões alimentados semanalmente ou menos comem prontamente quando o alimento é disponível (Willemart, 2007). Sugerimos que fêmeas possuem olfato menos sensível do que machos. Fisiologicamente, algumas das possibilidades é de que a alteração no comportamento do macho é fruto de alteração na recepção ou transporte de moléculas odoríferas ou na transdução. Essa diferença sexual pode ser um efeito colateral de seleção sexual, como machos encontrando fêmeas via olfato. Nosso trabalho chama a atenção para o cuidado necessário no controle do jejum em experimentos de olfação.

5. Referências Bibliográficas

Acosta, L. E. & Machado, G. (2007). Diet and foraging. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 309-338.

Aimé, P., Duchamp-Viret, P., Chaput, M. A., Savigner, A., Mahfouz, M. & Julliard, A. K. (2007). Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behavioural Brain Research* 179: 258–264.

Brito, N. F., Moreira, M. F. & Melo, A. C. A. (2016). A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *Journal of Insect Physiology* 95: 51–65.

Cardé, R. T. & Willis, M. A. (2008). Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. *Journal of Chemical Ecology* 34: 854–866.

Chang, H., Liu, Y., Yang, T., Pelosi, P., Dong, S. & Wang, G. (2015). Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports* 5:13093.

Costa, T. M. & Willemart, R. H. (2013). First experimental evidence that a harvestman (Arachnida: Opiliones) detects odors of non-rotten dead prey by olfaction. *Zoologia* 30: 359-361.

Costa, T. M., Hebets, E. A., Melo, D. & Willemart, R. H. (2016b). Costly learning: preference for familiar food persists despite negative impact on survival. *Biology Letters* 12: 20160256.

Costa, T. M., Silva, N. F. S. & Willemart, R. H. (2016a). Prey capture behavior in three Neotropical armored harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Journal of Ethology* 34: 183-190.

Cross, F. R. & Jackson, R. R. (2011). Effects of prey–spider odour on intraspecific interactions of araneophagic jumping spiders. *Journal of Ethology* 29: 321–327.

Cross, F. R. & Jackson, R. R. (2014). Cross-modality effects of prey odour during the intraspecific interactions of a mosquito-specialist predator. *Ethology* 120: 598–606.

Croy, M. I. & Hughes, R. N. (1991). The influence of hunger on feeding behaviour and on the acquisition of learned foraging skills by the fifteen-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. *Animal Behaviour* 41: 161-170.

Dodson, G. N., Lang, P. L., Jones, R. N. & Versprille, A. N. (2013). Specificity of attraction to floral chemistry in *Misumenoides formosipes* crab spiders. *Journal of Arachnology* 41: 36-42.

Elias, D. O., Mason, A. C. & Hoy, R. R. (2004). The effect of substrate on the efficacy of seismic courtship signal transmission in the jumping spider *Habronattus dossenus* (Araneae: Salticidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 4105-4110.

Farhadian, S. F., Suárez-Fariñas, M., Cho, C. E., Pellegrino, M. & Vosshall, L. B. (2012). Post-fasting olfactory, transcriptional, and feeding responses in *Drosophila*. *Physiology & Behavior* 105: 544–553.

Gainett, G., Michalik, P., Muller, C., Giribet, G., Talarico, G. & Willemart, R. H. (2017). Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). *Arthropod Structure & Development* 46: 178–195.

Giribet, G. & Sharma, P. P. (2015). Evolutionary biology of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Annual Review Entomology* 60: 157–75.

Gnaspini, P. (1996). Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestman from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Zoology* 239: 417-435.

Hebets, E. A. (2004). Attention-altering signal interactions in the multimodal courtship display of the wolf spider *Schizocosa uetzi*. *Behavioral Ecology* 16: 75-82.

Junnian, L., Jike, L. & Shuanglun, T. (2007). Effects of hunger and tannic acid on food intake and foraging behavior in *Microtus fortis*. *Acta Ecologica Sinica* 27: 4478–4484.

Kury, A. B. (2017). Classification of Opiliones. Museu Nacional/ UFRJ Website. URL: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.

Machado, G., Bonato, V. & Oliveira P. S. (2002). Alarm communication: A new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Naturwissenschaften* 89: 357–360.

McIntyre, M. E. & Vaughn, T. T. (1997). Effects of Food Deprivation and Olfactory and Visual Cues on Movement Patterns of Two *Eleodes* Species (Coleoptera: Tenebrionidae) in a Wind Tunnel. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 260-265.

Nosil, P. (2002). Food fights in house crickets, *Acheta domesticus*, and the effects of body size and hunger level. *Canadian Journal of Zoology* 80: 409–417.

Onzo, A., Hanna, R. & Sabelis, M. W. (2009). Within-plant migration of the predatory mite *Typhlodromalus aripo* from the apex to the leaves of cassava: Response to day–night cycle, prey location and prey density. *Journal of Insect Behavior* 22: 186–195.

Onzo, A., Hanna, R. & Sabelis, M. W. (2012). The predatory mite *Typhlodromalus aripo* prefers green-mite induced plant odours from pubescent cassava varieties. *Experimental and Applied Acarology* 58: 359–370.

Persons, M. H. (1999). Hunger effects on foraging responses to perceptual cues in immature and adult wolf spiders (Lycosidae). *Animal Behaviour* 57: 81–88.

Reisenman, C. E. (2014). Hunger is the best spice: Effects of starvation in the antennal responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 71: 8–13.

Reisenman, C. E., Lee, Y., Gregory, T. & Guerenstein, P. G. (2013). Effects of starvation on the olfactory responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 59: 717–721.

Santos, G. C., Hogan, J. A. & Willemart, R. H. (2013). Associative learning in a harvestman (Arachnida, Opiliones). *Behavioural Processes* 100: 64–66.

Stafford, L. D. & Welbeck, K. (2011). High hunger state increases olfactory sensitivity to neutral but not food odors. *Chemical Senses* 36: 189–198.

Takken, W., van Loon J. J. A. & Adam, W. (2001). Inhibition of host-seeking response and olfactory responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *Journal of Insect Physiology* 47: 303–310.

Ulusoya, S., Dinca, M. E., Dalgica, A., Topaka, M., Dizdarb, D. & Is, A. (2016). Are people who have a better smell sense, more affected from satiation? *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. In press.

Walker, S. E., Marshall, S. D., Rypstra, A. L. & Taylor, D. H. (1999). The effects of hunger on locomotory behaviour in two species of wolf spider (Araneae, Lycosidae). *Animal Behaviour* 58: 515–520.

Willemart, R. H. & Chelini, M. C. (2007). Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman *Iporangaia pustulosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 73-79.

Willemart, R. H. (2007). Rearing and Maintenance of Animals in Captivity. In Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp. 520-524.

Willemart, R. H., Farine, J.-P. & Gnaspini, P. (2009). Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): A review, with new morphological data on 18 species. *Acta Zoologica* 90: 209–227.

Conclusão Geral

Os resultados do primeiro capítulo mostram que machos do opilião *Mischonyx cuspidatus* (Gonyleptidae) são atraídos pelo odor de machos coespecíficos e talvez essa atração possa favorecer a formação inicial de agregados com viés de machos. As fêmeas por outro lado não foram atraídas nem por machos e nem por fêmeas e talvez não tenham o olfato tão sensível quanto o dos machos de *M. cuspidatus*. Talvez a maior sensibilidade olfativa de machos tenha origem sexual para encontro de fêmeas que possivelmente não estavam liberando voláteis no momento de nosso experimento.

Os resultados do segundo capítulo mostram que o opilião *Neosadocus maximus* (Gonyleptidae) é atraído por químicos próprios voláteis deixados previamente nos abrigos. Esses químicos podem ser deixados no ambiente por meio de deposição passiva, conforme o deslocamento do animal no ambiente ou por meio ativo, por meio de raspagem de glândulas específicas no ambiente. Os indivíduos de *N. maximus* direcionam as pernas I e II à fonte de odor e esse comportamento reforça os dados morfológicos de Gainett et al. (2017) de que há cerdas olfativas nas pernas I e II.

No terceiro capítulo, os resultados mostram que machos de *M. cuspidatus* são atraídos por químicos voláteis de banana após jejum de três semanas mas não após jejum de 1 semana, sugerindo alteração na sensibilidade olfativa em machos de *M. cuspidatus*. Fisiologicamente, essa alteração na sensibilidade olfativa pode estar associada a mudanças na recepção ou transporte de moléculas odoríferas, ou ainda na transdução de sinal. Fêmeas não detectaram o odor da banana. Essa diferença sexual pode ser uma exaptação fruto primariamente de seleção sexual (machos detectarem odor de fêmeas).

Aqui reportamos pela primeira vez o uso do olfato experimentalmente a longa distância (50 cm). Nossos dados mostram que a olfação em Opiliones é mais importante do que é considerado atualmente na literatura. Consideramos importante que os próximos estudos considerem o uso do olfato no comportamento animal, bem como o efeito do jejum no uso do olfato.