

Taís Maria de Nazareth Gonçalves

**Custos da defesa química em opiliões
(Arachnida: Opiliones)**

**Costs of chemical defense in harvestmen
(Arachnida: Opiliones)**

Orientador: Dr. Glauco Machado

São Paulo
2015

Taís Maria de Nazareth Gonçalves

**Custos da defesa química em opiliões
(Arachnida: Opiliones)**

**Costs of chemical defense in harvestmen
(Arachnida: Opiliones)**

	Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área "Ecologia".
--	--

Orientador: Prof. Dr. Glauco Machado
Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo

São Paulo
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Taís Maria de Nazareth

Custos da defesa química em opiliões (Arachnida: Opiliones) / Taís Maria de Nazareth Gonçalves; Orientador Glauco Machado. --. São Paulo 2015.

71f

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

1. Palavra-Chave Principal: Defesa química, 2. Palavra-Chave Secundária: Custos e benefícios, 3. Palavra-Chave Secundária: Reprodução. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia. II. Custos da defesa química em opiliões (Arachnida: Opiliones)



by Bill Waterson

Sumário

Agradecimentos	07
Resumo	09
Abstract	10
Introdução geral	11
Referências	15
Capítulo 1: Egg production constrains chemical defenses in a neotropical arachnid	18
Abstract	19
Introduction	20
Methods	23
Study species	23
Collection of individuals	23
Production of chemical defenses	24
Bioassays	25
Tests with ants	26
Test with spiders	27
Results	27
Production of chemical defenses	27
Tests with ants	29
Tests with spiders	30
Discussion	31
Acknowledgments	34
References	35
Capítulo 2: Chemical defense as a condition-dependent trait in harvestmen (Arachnida: Opiliones)	38
Abstract	39
Introduction	40
Methods and Materials	41
Collection of individuals and maintenance	41
Initial quantification of defensive secretions	42
Experimental setup	42
Statistical analyses	43
Results	44
Discussion	46
Acknowledgments	48
References	48
Supplementary Material	51
Table S1	51

Capítulo 3: Does mating effort compromise male investment in chemical defenses? A comparative study in a clade of neotropical harvestmen (Arachnida: Opiliones)	52
Abstract	53
Introduction	54
Methods and Materials	55
Data collection	55
Statistical analyses	56
Results	57
Discussion	58
Acknowledgments	60
References	60
Electronic Supplementary Material	63
Concentration of benzoquinones	63
Table S1	64
Table S2	65
Figure S1	66
Figure S2	67
Figure S3	68
Conclusão geral	69

Agradecimentos

Gostaria de começar meus agradecimentos a pessoa mais importante da minha vida! Sem ele com certeza não estaria aqui. Sem dúvida nenhuma ele foi meu maior incentivador e continua sendo. Gu, você é o único que sabe o que realmente eu passei e me ajudou a seguir em frente. Muito obrigada por existir na minha vida! Te amo muito!

Gostaria de agradecer também ao meu orientador Glauco Machado que mesmo depois de quatro anos me incentivou a voltar e me ensinou praticamente tudo que sei hoje. Obrigada por ser um grande amigo e incentivador. Você é um dos melhores pesquisadores que conheço.

Minha família também não pode ficar de fora. Sou muito feliz por ter vocês ao meu lado, me incentivando e acreditando que o que eu faço é fantástico! Mãe, raramente digo isso mas a senhora é a melhor mãe do mundo! Tiago e Tati, amo vocês demais e sou muito feliz por ter vocês ao meu lado, mesmo que longe! Obrigada por lerem meus artigos. Pina e Tim, vocês são a família que eu escolhi, obrigada pelas comidinhas gostosas, pelo carinho e por me acolherem como filha.

Essa tese teve colaborações de diversas pessoas que fizeram e fazem parte da minha vida. Essas pessoas me ajudaram de diferentes formas e espero ter a amizade de vocês pelo resto da vida. Por ordem cronológica gostaria de agradecer a professora Carmen Rossine por me introduzir nesse mundo da química, me ajudar a desenvolver uma parte da minha tese sem a qual não seria possível concluir todo o resto. Obrigada também ao professor Andrés Gonzalez Ritzel, Emílio Deagosto, Paula Altesor, Calos Toscano, Estefanía Stanley pela ajuda nos meus “perrengues” durante minha estadia no Uruguai, pelos passeios, caronas, pelas conversas e companhia nos momentos difíceis.

Obrigada professor José Roberto Trigo pela oportunidade de cursar sua disciplina onde pude aprender muito. Ao professor José Eduardo por me ensinar um pouquinho sobre metabolismo, o que pode me abrir a mente para pesquisas futuras. Aos professores e alunos da UFABC com quem tive oportunidade de conviver e que de uma forma ou de outra ajudaram na realização desse trabalho. A Dra Daniela Rocha da UNICAMP, pelos conselhos, amizade e principalmente por me ajudar na parte química do meu trabalho me ajudando a achar soluções para os problemas que apareceram. Ao professor Adriano Kury e todos do seu laboratório no Museu Nacional do Rio de Janeiro, que me receberam e me ajudaram a coletar nessa cidade tão linda. Por fim, aos Professores Renato Crespo e Silvana Vianna Rodrigues e aos meus amigos Daniela Sudatti, Vinnícius F. Brant, Jonas Ávila e Adriana Barreto por cederem um lugarzinho no laboratório de vocês e por me receberem de uma forma tão carinhosa e solícita. Nunca vou esquecer o que vocês fizeram por mim!

A Daniela Sudatti quero fazer um agradecimento especial. Primeiro por me receber na sua casa quando você nem mesmo me conhecia. Obrigada por ceder sua casa como laboratório e não ficar doída quando brotavam opiliões de todas as partes. Obrigada por me ensinar tudo que sei sobre GC. Obrigada por segurar minha “mãozinha” nos momentos mais difíceis que passei no meu doutorado. Obrigada pelas broncas que me fazia acordar e não me deixava surtar. Obrigada por ser um exemplo de pesquisadora e pessoal, por ser sempre correta no que faz. Conversar com você me fez aprender a ser uma pessoa e uma profissional melhor. Você tornou meu doutorado possível quando todas as portas se fecharam. Muito obrigada pela ajuda, pelo acolhimento e por se tornar uma amiga para sempre.

Obrigada à LAGE, a todos os amigos que passaram e outros que ficaram e que sem dúvida me ajudaram muito! Camila Mandai que me socorreu varias vezes em momentos de desespero com o R. Obrigada por ser minha amiga e estar presente mesmo longe. Ao Edu pelas conversas, pela ajuda nas análises sem o qual um dos capítulos dessa tese não teria sido possível, obrigada pela amizade e por se tornar um grande amigo. A Soly, pela alegria e ajuda de campo. Renatcho, pela ajuda no campo mais difícil que tivemos com uma maratona

de quase dois dias seguidos sem interrupção. Ao Billy, pela ajuda nos modelos, amizade e pelos momentos de conselhos, você mora no meu coração. Ao Matheus e ao Andrés pela ajuda no campo. A minha querida Louise, pela parceria, por escutar meus momentos de “chatices” e pela maravilhosa companhia no campo por quase 8 meses. Aos demais membros do SexLab, Erika, Vivian, Danilo, Rosannette, Lygia, Sheina e Cris pelas reuniões de laboratório que sempre foram produtivas.

Agradeço também à Cecília e à Elisa que me hospedaram em suas respectivas casas, uma no Rio de Janeiro e a outra em Manaus.

Também queria agradecer todo o pessoal do Parque Estadual de Intervales em especial ao Aparecido que nos ajudou imensamente no campo tanto na coleta dos dados como alegrando a equipe no campo que por muitas vezes foi cansativo.

Aos Prof. Paulo Inácio, pelas disciplinas oferecidas que contribuíram muito para minha formação. Aos professores Rodrigo Hirata, Taran Grant, Luis Shiesari pelos comentários durante minha minha qualificação.

Agradeço ao apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- processo 2011/50800-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas que eu e o Glauco recebemos e que nos permitiram desenvolver este projeto. A PROAP e Pró-reitora de Pesquisa da USP pelos auxílios recebidos para participação em eventos internacionais.

Por fim gostaria de agradecer aos membros da banca examinadora Dr. Alberto José Arab Olavarrietae, Dr. Andrés Gonzalez Ritzel, Dr. Nicolas Châline, e Dra. Mônica Frank Kersch Becker, Dr. Gustavo Requena, Dra. Denise Araujo, Dra. Daniele Rocha e Dra. Cibele Biondo pela disposição a ler minha tese incluindo aqui os demais professores que aceitaram ser suplentes.

Muito Obrigada a todos!!!

Resumo

As formas de defesa encontradas na natureza são incrivelmente diversas e envolvem estratégias que minimizam as chances de encontro com o predador ou as chances de escape diante de um ataque. A liberação de substâncias químicas é uma forma de defesa amplamente difundida entre artrópodes e vários estudos já demonstraram sua eficiência contra o ataque de predadores. Apesar de trazerem benefícios óbvios em termos de defesa, a produção de vários desses compostos químicos deve ser custosa para as presas. Esta tese teve como objetivo geral explorar os custos da produção de defesas químicas em um grupo particular de artrópodes, os opiliões. No capítulo 1, investigamos como a produção de ovos pode comprometer a produção de defesas químicas (benzoquinonas) e quais as conseqüências da redução do volume de secreção liberada sobre a capacidade de defesa das fêmeas de *Acutisoma longipes*. Nossos resultados apontam que a quantidade de secreção produzida por fêmeas ovígeras é quase 50% inferior à das fêmeas não-ovígeras. Como conseqüência, a secreção liberada por fêmeas ovígeras é menos eficiente em deter formigas e aranhas do que a secreção liberada por fêmeas não-ovígeras. No capítulo 2, investigamos como a quantidade e a qualidade da dieta influenciam a produção de defesas químicas (benzoquinonas) em *Magnispina neptunus*. Demonstramos que a produção de defesas químicas é condição dependente, pois indivíduos bem alimentados produziram mais secreção que indivíduos mal alimentados. Entretanto, indivíduos que receberam aporte extra dos precursores da secreção não incrementaram nem a quantidade total nem a concentração da secreção. Por fim, o capítulo 3 teve como objetivo investigar possíveis demandas conflitantes (*trade-offs*) entre o esforço de acasalamento (produção de armamentos) e o esforço somático (defesas químicas) de machos e fêmeas em um clado de opiliões neotropicais. Usando uma abordagem comparativa, mostramos que fêmeas produzem mais defesas químicas (benzoquinonas) que machos, mas não há uma relação negativa entre o dimorfismo sexual morfológico e o dimorfismo na quantidade de defesas químicas produzidas por machos e fêmeas. Coletivamente, os resultados obtidos aqui apontam que a produção de defesas químicas em opiliões é custosa e que está sujeita a demandas conflitantes com outros componentes de aptidão.

Abstract

The forms of animal defenses found in nature are incredibly diverse and comprise many strategies that minimize the chances of a prey being detected or attacked by a predator. The emission of chemical secretions is a widespread defense among arthropods, and several studies have already demonstrated the efficiency of chemical defenses against predation. Although chemical defenses confer obvious survival benefits, the production of deterrent compounds may be costly for the individuals. The main goal of this thesis was to evaluate the costs of producing chemical defenses in a particular arthropod group, the harvestmen. In chapter 1 we investigated how egg production may compromise the production of chemical defenses (benzoquinones) by females of *Acutisoma longipes*, and whether a reduction in the amount of secretions released by ovigerous females make them more vulnerable to predation. Our results indicate that ovigerous females produce almost 50% less secretion than non-ovigerous females. Moreover, the low amount of secretion released by ovigerous females is less efficient than the amount released by non-ovigerous females in deterring ants and spiders. In chapter 2 we investigated how the quantity and quality of food influence the production of chemical defenses (benzoquinones) in *Magnispina neptunus*. We demonstrate that the production of chemical defenses is clearly condition dependent because well fed individuals produced more secretion than poorly fed individuals. However, individuals that received in the diet an input of the benzoquinones' precursor did not show an increase in the amount and concentration of secretion released. Finally, in chapter 3 we investigated possible trade-offs between mating effort (i.e., investment in weaponry) and somatic effort (i.e., investment in chemical secretions) in males and females of several harvestman species belonging to the family Gonyleptidae. Using a comparative approach, we showed that females consistently produce more secretion than males, but there is no negative relationship between morphological sexual dimorphism and sexual dimorphism in the amount of secretion released by males and females. Taken together, our findings indicate that the production of chemical defenses in harvestmen is costly and is under allocation trade-offs with other fitness components.

Introdução geral

Todos os animais precisam se defender de predadores em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida. As formas de defesa encontradas na natureza são incrivelmente diversas e incluem tanto adaptações morfológicas quanto comportamentais que aumentam a probabilidade de sobrevivência das presas. Em geral, as primeiras linhas defensivas simplesmente diminuem a chance de uma presa ser encontrada pelo predador e envolvem defesas como a camuflagem e a redução da locomoção ou da produção de ruídos (Edmunds, 1974; Ruxton *et al.*, 2004). Entretanto, mesmo presas que apresentam tais defesas podem se deparar com predadores. Nessa situação, outro conjunto de defesas é empregado, envolvendo mecanismos de desencorajamento do ataque pelo predador. Por exemplo, presas podem assustar o predador exibindo ocelos ou colorações conspícuas, podem ameaçar o predador parecendo maiores ou atacando-o com pinças, garras ou espinhos ou podem ainda se fingir de mortas e desencorajar o predador pelo risco de consumo de um alimento em decomposição (Edmunds, 1974; Ruxton *et al.*, 2004). Eventualmente, mesmo usando linhas secundárias de defesa, a presa pode ser capturada e é neste momento que uma terceira linha defensiva, normalmente com alto custo energético, é empregada: a liberação de substâncias químicas que podem ser tóxicas ou irritantes para o predador (Edmunds, 1974; Berenbaum, 1995).

Existe uma diversidade enorme de compostos químicos utilizados como defesa pelos animais. Entre os artrópodes, os compostos secretados incluem ácidos, aldeídos, cetonas, ésteres, hidrocarbonetos, lactonas, fenóis e benzoquinonas (Blum, 1981; Whitman *et al.*, 1990; Eisner *et al.*, 2005). Apesar de trazerem benefícios óbvios em termos de defesa, a produção de vários desses compostos químicos provavelmente é custosa para as presas (e.g., Cohen, 1985; Zalucki *et al.*, 2001; Skelhorn & Ruxton, 2007). Portanto, mesmo que defesas químicas sejam eficientes contra predadores, um alto custo energético em sua produção poderia explicar porque elas são comumente utilizadas como último recurso diante do ataque de um predador (Whitman *et al.*, 1990). Adicionalmente, adaptações na forma de liberação de defesas químicas permitem que elas sejam usadas com máxima eficácia e mínimo desperdício. Espécies que liberam secreção na forma de *spray*, por exemplo, geralmente possuem a capacidade de apontá-lo diretamente para o corpo do predador (e.g., Eisner & Meinwald, 1966; Gnaspini & Hara, 2007). Algumas espécies possuem mais de uma glândula de secreção defensiva espalhada pelo corpo e, dependendo do local de ataque do predador, a presa pode utilizar o conteúdo de uma ou mais glândulas de forma a maximizar a defesa e minimizar os possíveis custos da liberação maciça de secreção. Esse é o caso dos diplópodes,

que possuem um par de glândulas defensivas por segmento e, se o estímulo do predador for localizado, as glândulas mais próximas respondem liberando secreção (e.g., Eisner & Meinwald, 1966).

Uma forma de diminuir os possíveis custos associados às defesas químicas é o seqüestro de compostos a partir da dieta, o que pode ser feito consumindo tanto animais quanto plantas, que são os reais produtores dos metabólitos defensivos (Lindquist & Hay, 1995). Grande parte dos estudos que têm como objetivo relacionar a dieta com a eficácia da defesa foi feita com invertebrados que se alimentam de plantas das quais seqüestram seus compostos químicos (Jones *et al.*, 1987; Brower *et al.*, 1982, 1984). Um caso interessante é o da borboleta *Cosmosoma myrodora*, em que machos seqüestram substâncias químicas defensivas de plantas e, por meio do acasalamento, as fêmeas recebem estas substâncias dos machos e adquirem proteção química (Conner *et al.*, 2000). Invertebrados que seqüestram compostos químicos são relativamente bem estudados e os custos associados às defesas químicas são considerados baixos. Para invertebrados que produzem seus próprios compostos defensivos, entretanto, nosso conhecimento sobre os efeitos da dieta é mais limitado. Para as espécies autógenas, ou seja, aquelas que produzem seus próprios compostos defensivos, a classe de compostos produzidos deve determinar a composição ideal da dieta (e.g., Byers, 2015). Proteínas e carboidratos, por exemplo, fornecem aminoácidos e energia, que são limitantes tanto para o crescimento quanto para a montagem de defesas imunológicas e químicas (Schoonhoven *et al.*, 2005; Karasov & Martínez del Rio, 2007; Roeder & Behmer, 2014). Portanto, a qualidade do alimento que os indivíduos consomem deve estar diretamente relacionada com a qualidade e a quantidade de defesas que eles irão produzir.

A alocação de energia e recursos para uma atividade biológica comumente implica em redução na energia e recursos disponíveis para outras atividades, gerando o que se conhece como demandas conflitantes ou *trade-offs* (Harshman & Zera, 2007). O investimento em crescimento, por exemplo, pode depreciar o investimento em reprodução e defesa tanto em plantas quanto em animais (Roff, 2002). De fato, um estudo com sete espécies de esponjas do Caribe demonstrou haver uma relação negativa entre a taxa de crescimento e resistência à predação promovida por espículas e compostos químicos (Leong & Pawlik, 2010). Dessa forma, a maneira pela qual a alocação de energia e recursos é feita pode ter influência direta sobre a aptidão dos indivíduos (Magrath & Kondeur, 2003). Além disso, a seleção sexual impõe pressões seletivas diferentes sobre machos e fêmeas, resultando em uma clara dicotomia em relação às estratégias de alocação de energia entre os indivíduos de cada sexo (Roff, 2002). Em virtude da seleção para maximizar a fecundidade e a sobrevivência da prole,

fêmeas alocam recursos e energia predominantemente no esforço somático, que afeta diretamente a longevidade e indiretamente a fecundidade, e no esforço parental, que beneficia a aptidão dos filhotes. Machos, por sua vez, investem em formas de maximizar o sucesso de acasalamento, o que leva a uma redução na alocação de recursos e energia para os esforços somático e parental (Roff, 2002).

Um exemplo bem estudado das diferenças entre machos e fêmeas em relação à alocação de recursos e energia, é o dimorfismo sexual em imunocompetência observado em muitas espécies de animais (Stoehr & Kokko, 2006). Esse dimorfismo sexual é entendido como resultado da demanda conflitante entre o esforço de acasalamento e a defesa imune. Dado o maior investimento dos machos no esforço de acasalamento, ocorre um comprometimento do esforço somático, em particular, da imunocompetência. No caso das fêmeas, um maior investimento em imunocompetência é favorecido, pois acarreta em maior longevidade e maior fecundidade (Roff, 2002). Apesar de toda atenção dedicada à imunocompetência nos últimos anos, vale destacar que ela é apenas um dos componentes do esforço somático. Pouca ou nenhuma atenção tem sido dispensada a outros componentes do esforço somático que podem aumentar a longevidade dos indivíduos, tais como defesas químicas. Assim como a maioria das respostas imunológicas de artrópodes, as defesas químicas são inespecíficas (Schmid-Hempel, 2005), ou seja, não são direcionadas a inimigos naturais em particular, porém envolvem gastos metabólicos sendo, portanto, custosas para os indivíduos (Bowers, 1992). Nesse contexto, seria esperado que o mesmo padrão de dimorfismo sexual em imunocompetência fosse encontrado também nas defesas químicas.

Um grupo de organismos adequado para estudos sobre custos e benefícios das defesas químicas são os opiliões, que constituem a terceira maior ordem em número de espécies dentro da classe Arachnida, com cerca de 6.500 espécies descritas (Machado *et al.*, 2007). Todas as espécies da ordem possuem um par de glândulas exócrinas localizadas nas margens anteriores do cefalotórax, perto da base da segundo par de pernas (Shultz, 1990). Essas glândulas são mais comumente conhecidas como glândulas odoríferas ou repugnatórias (Holmberg, 1983), pois liberam uma secreção de odor desagradável composta por uma grande variedade de compostos químicos, tais como fenóis, quinonas, alcoóis ou cetonas, dependendo do táxon em questão (revisão em Raspotnig *et al.*, 2015). A secreção liberada parece ser altamente eficaz contra a maioria dos inimigos naturais dos opiliões, incluindo vertebrados e invertebrados (e.g., Eisner *et al.*, 1971; 2004; Machado *et al.*, 2005). Embora a defesa química seja considerada o mecanismo de defesa mais eficaz em opiliões (Eisner *et al.*, 1978), esta parece ser empregada apenas quando todos os outros mecanismos

de defesa não obtiveram sucesso em impedir o ataque de predadores (Duffield *et al.*, 1981; Pomini *et al.*, 2010). Portanto, a produção dos compostos liberados pelas glândulas repugnatórias dos opiliões provavelmente é custosa e espera-se que sua emissão seja a última linha de defesa contra o ataque de um predador.

O primeiro trabalho sobre a natureza química da secreção repugnatória em opiliões foi realizado com *Acanthopachylus aculeatus* (Gonyleptidae), que libera benzoquinonas (Estable *et al.*, 1955). O composto liberado ficou conhecido como “gonyleptidina” e vários estudos subsequentes investigaram seus efeitos farmacológicos (Ardao & Freyre, 1956; Freyre *et al.*, 1958; Sáez & Drets, 1958). Somente no início do século XXI é que a eficiência da gonyleptidina contra predadores foi formalmente investigada (Eisner *et al.*, 2004). Atualmente, mais de 100 espécies de opiliões tiveram sua secreção defensiva caracterizada quimicamente (Raspotnig *et al.*, 2015), porém os trabalhos que testaram experimentalmente a função biológica desses compostos não ultrapassam uma dezena. Machado *et al.* (2002), por exemplo, demonstraram que a mistura de benzoquinonas liberada por *Serracutisoma gnaspinae* (Gonyleptidae) funciona como feromônio de alarme, induzindo a dispersão de indivíduos agregados. Pouco tempo depois, Eisner *et al.* (2004) e Machado *et al.* (2005) demonstraram que as benzoquinonas contidas na secreção repugnatória de *Acanthopachylus aculeatus* e *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae), respectivamente, são potentes repelentes de formigas, aranhas e sapos. Apesar de lançarem luz sobre as possíveis funções biológicas dos compostos defensivos liberados pelos opiliões, todos os trabalhos publicados até o momento estão focados nos benefícios e nenhuma informação específica sobre custos foi explorada.

Recentemente, foi demonstrada experimentalmente a rota biossintética para a produção de benzoquinonas em opiliões da família Gonyleptidae (Rocha *et al.*, 2013). Adicionalmente, os autores também descobriram que os precursores dessas benzoquinonas são o acetato e o proprionato, duas moléculas amplamente utilizadas em rotas policetídicas em artrópodes (Morgan, 2004). A descoberta da rota biossintética para a produção de benzoquinonas em opiliões abre as portas para a investigação dos custos da produção de compostos defensivos no grupo. Uma vez que sabemos quais são os principais precursores, é possível explorar possíveis demandas conflitantes na alocação de recursos entre defesas e outras atividades, tal como a produção de ovos. Adicionalmente, é possível explorar os efeitos da quantidade e qualidade da dieta sobre a produção de benzoquinonas. Por fim, dada a enorme variação na intensidade do dimorfismo sexual em opiliões (Buzatto *et al.*, 2014), é possível explorar também se machos e fêmeas diferem na alocação de recursos para a produção de defesas químicas.

Esta tese tem como objetivo geral explorar os custos da produção de defesas químicas em opiliões e, para tanto, está dividida em três capítulos. No capítulo 1, investigamos como a produção de ovos pode comprometer a produção de defesas químicas e quais são as conseqüências da redução do volume de secreção liberada sobre a capacidade de defesa das fêmeas. No capítulo 2, investigamos como a quantidade e a qualidade da dieta influenciam a produção de defesas químicas. Por fim, o capítulo 3 teve como objetivos compreender as demandas conflitantes entre esforço de acasalamento (produção de armamentos e defesa territorial) e esforço somático (defesas químicas) entre machos e fêmeas.

Referências

- Ardao MI & Freyre HA (1956) Effect of gonyleptidine on the metabolism of mammalian erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63:334-342
- Berenbaum MR (1995) The chemistry of defense: theory and practice. *In: The Chemistry of Biotic Interaction* (eds Eisner T & Meinwald J). Washington: National Academy Press, 1-16
- Blum MS (1981) *Chemical Defenses of Arthropods*. New York: Academic Press
- Bowers MD (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. *In: Insect Chemical Ecology: An Evolutionary Approach* (eds Roitberg BD & Isman MB). New York: Chapman & Hall, 216-244
- Brower LP, Seiber JN, Nelson CJ, Lynch SP & Tuskes PM (1982) Plant-determined variation in the cardenolide content, thin-layer chromatography profiles and emetic potency of monarch butterflies, *Danaus plexippus* L., reared on the milkweed, *Asclepias eriocarpa* in California. *J. Chem. Ecol.*, 8:579-634
- Brower LP, Seiber JN, Nelson CJ, Lynch SP & Holland MM (1984) Plant determined variation in the cardenolide content, thin-layer chromatography profiles and emetic potency of monarch butterflies, *Danaus plexippus* L. reared on milkweed plants in California. 2. *Asclepias speciosa*. *J. Chem. Ecol.* 10:601-639
- Buzatto BA, Tomkins JL, Simmons LW & Machado G (2014) Correlated evolution of sexual dimorphism and male dimorphism in a clade of Neotropical harvestmen. *Evolution*, 68:1671-1686
- Byers J (2015) Earwigs (*Labidura riparia*) mimic rotting-flesh odor to deceive vertebrate predators *Naturwissenschaften*, in press (doi: 10.1007/s00114-015-1288-1)
- Cohen JA (1985) Differences and similarities in cardenolide contents of queen and monarch butterflies in Florida and their ecological and evolutionary implications. *J. Chem. Ecol.*, 11:85-103
- Conner WE, Boada R, Schroeder FC, Gonzalez A, Meinwald J & Eisner T (2000) Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:14406-14411
- Duffield RM, Olubajo O, Wheeler JW & Shear WA (1981) Allylphenols in the defensive secretion of the nearctic opilionid, *Stygnomma spinifer* (Arachnida: Opiliones). *J. Chem. Ecol.*, 7:445-453
- Edmunds M (1974) *Defence in Animals: A Survey of Antipredator Defences*. Harlow: Longman
- Eisner T & Meinwald J (1966) Defensive secretion of arthropods. *Science*, 153:1341-1350
- Eisner T, Rossini C, González A & Eisner M (2004) Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *J. Exp. Biol.*, 207:1313-1321

- Eisner T, Alsop D & Meinwald J (1978) Secretions of opilionids, whip scorpions, and pseudoscorpions. *In: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* (ed Bettini S), Berlin: Springer-Verlag, 87-99
- Eisner T, Kluge F, Carrel JE & Meinwald J (1971) Defense of a phalangid: liquid repellent administered by leg dabbing. *Science*, 173:650-652
- Eisner T, Eisner M & Seigler M (2005) *Secret Weapons: Defenses of Insects, Spiders, and Other Many-Legged Creatures*. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press
- Estable C, Ardao MI, Brasil NP & Fieser LF (1955) Gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:4942
- Freyre HA, Rovira M & Ardao MI (1958) Toxicidad de metil-1,4 benzoquinonas y metil-1,4 benzohidroquinonas. *Archiv. Soc. Biol. Montevideo*, 24:82-88
- Gnaspini P & Hara MR (2007) Defense mechanisms. *In: Harvestmen: the Biology of Opiliones* (eds Pinto-da-Rocha R, Machado G & Giribet G), Cambridge: Harvard University Press, 374-399
- Harshman LG & Zera AJ (2007) The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.*, 22:80-86
- Holmberg RG (1983) The scent glands of Opiliones: a review of their function. *Proceedings of the 5th Congress International of Arachnology*, 131-133
- Jones CG, Hess TA, Whitman DW, Silk PJ & Blum MS (1987) Effects of diet breadth on autogenous chemical defense of a generalist grasshopper. *J. Chem. Ecol.*, 13:283-297
- Karasov WH & Martinez del Rio C (2007) *Physiological ecology. In: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Princeton, NJ: Princeton University Press
- Leong W & Pawlik JR (2010) Evidence of a resource trade-off between growth and chemical defenses among Caribbean coral reef sponges. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 406:71-78
- Lindquist N & Hay ME (1995) Can small rare prey be chemically defended? The case for marine larvae. *Ecology*, 76:1347-1358
- Machado G, Carrera PC, Pomini AM & Marsaioli AJ (2005) Chemical defense in harvestmen (Arachnida: Opiliones): do benzoquinone secretions deter invertebrate and vertebrate predators? *J. Chem. Ecol.*, 31:2519-2539
- Machado G, Pinto-da-Rocha R & Giribet G (2007) What are harvestmen? *In: Harvestmen: the Biology of Opiliones* (eds Pinto-da-Rocha R, Machado G & Giribet G), Cambridge: Harvard University Press, 1-13
- Machado G, Bonato V & Oliveira PS (2002) Alarm communication: a new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Naturwissenschaften*, 89:357-360
- Magrath MJL, Komdeur J (2003) Is male care compromised by additional mating opportunity? *Trends Ecol. Evol.*, 18:424-430
- Morgan ED. (2004) *Biosynthesis in insects*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry
- Pomini AM, Machado G, Pinto-da-Rocha R, Macías-Ordóñez R & Marsaioli AJ (2010) Lines of defense in the harvestman *Hoplobunus mexicanus* (Arachnida: Opiliones): aposematism, stridulation, thanatosis, and irritant chemicals. *Biochem. Syst. Ecol.*, 38:300-308
- Rasputnig G, Bodner M, Schäffer S, Koblmüller S, Schönhofer A & Karaman I (2015) Chemosystematics in the Opiliones (Arachnida): a comment on the evolutionary history of alkylphenols and benzoquinones in the scent gland secretions of Laniatores. *Cladistics*, 3:202-209
- Rocha DFO, Wouters FC, Zampieri DS, Brocksom TJ, Machado G & Marsaioli AJ (2013) Harvestman phenols and benzoquinones: characterization and biosynthetic pathway. *Molecules*, 18:11429-11451
- Roeder KA & Behmer ST (2014) Lifetime consequences of food protein-carbohydrate content for an insect herbivore. *Funct. Ecol.*, 28:1135-1143
- Rolff J & Siva-Jothy MT (2002) Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99:9916-9918

- Ruxton GD, Sherratt TN & Speed MP (2004) *Avoiding Attack. The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*. Oxford: Oxford University Press
- Sáez FA & Drets ME (1958) The action of gonyleptidine on the mitotic and meiotic chromosomes and on the interphase nucleus. *Portug. Acta Biol.*, 5:287-296
- Schmid-Hempel P (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.*, 50:529-551
- Shultz JW (1990) Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics*, 6:1-38
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA & Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*. Oxford: Oxford University Press
- Skelhorn J & Ruxton GD (2007) Ecological factors influencing the evolution of insects chemical defenses. *Behav. Ecol.*, 19: 146-153
- Stoehr AM & Kokko H (2006) Sexual dimorphism in immunocompetence: what does life-history theory predict? *Behav. Ecol.*, 17:751-756
- Whitman DW, Blum MB & Alsop DW (1990) Allomonones: chemicals for defense. *In: Insect Defenses* (eds Evans DL & Smith J), New York: State University of New York Academic Press, 289-351
- Zalucki MP, Malcolm SB, Paine TD, Hanlon CC, Brower LP & Clarke AR (2001) It's the first bites that count: survival of first-instar monarchs on milkweeds. *Austral Ecol.*, 26: 547-555

Conclusão geral

Esta tese foi pensada para explorar uma lacuna importante em nosso conhecimento sobre ecologia química: quais são os custos de produzir compostos químicos defensivos em artrópodes? Para isso, selecionamos várias espécies de opiliões como modelo de estudo e conduzimos tanto estudos experimentais quanto análises comparativas. A seguir, apresentamos as principais conclusões alcançadas em cada um dos capítulos que fizeram parte da tese.

No capítulo 1, investigamos como a produção de ovos pode comprometer a produção de defesas químicas compostas por benzoquinonas e quais são as consequências da redução da quantidade de secreção liberada sobre a capacidade de defesa das fêmeas de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae). Nossos resultados apontam que a quantidade de secreção produzida por fêmeas ovígeras é quase 50% inferior à das fêmeas não-ovígeras, indicando que existe uma demanda conflitante (*trade-off*) entre produção de ovos e de defesas químicas. Se a produção de defesas químicas não fosse custosa, não esperaríamos que a produção de benzoquinonas fosse ser diminuída durante a produção de ovos. Adicionalmente, demonstramos experimentalmente que a secreção liberada por fêmeas ovígeras é menos eficiente em deter inimigos naturais, tais como formigas e aranhas. Portanto, a produção de ovos parece ser um momento crítico na vida das fêmeas, representando talvez um dos maiores custos da reprodução em opiliões.

No capítulo 2, investigamos como a quantidade e a qualidade da dieta influenciam a produção de defesas químicas compostas por benzoquinonas em *Magnispina neptunus* (Gonyleptidae). Demonstramos que a produção de defesas químicas é dependente da condição, pois indivíduos (tanto machos quanto fêmeas) bem alimentados produziram mais secreção do que indivíduos mal alimentados. Entretanto, indivíduos que receberam um aporte extra de acetato, molécula precursora das benzoquinonas em opiliões, não incrementaram nem a quantidade total nem a concentração da secreção defensiva. Considerando que machos de *M. neptunus* reduzem drasticamente a frequência de forrageio durante o período em que estão cuidando dos ovos, a restrição alimentar imposta pelo cuidado paternal e a consequente redução na quantidade de defesas químicas produzidas podem fazer com que os indivíduos cuidadores estejam mais vulneráveis à predação.

No capítulo 3, investigamos se possíveis demandas conflitantes entre o esforço de acasalamento e o esforço somático geram um padrão macro-evolutivo segundo o qual o incremento no dimorfismo sexual na produção de defesas químicas está inversamente correlacionado com o dimorfismo sexual morfológico. Usando uma abordagem comparativa com oito espécies da família Gonyleptidae, mostramos que fêmeas produzem mais defesas químicas que machos, tanto em massa quanto em concentração de benzoquinonas. Entretanto, não houve uma relação negativa entre o dimorfismo sexual na produção de defesas químicas e o dimorfismo sexual morfológico, que foi nossa variável operacional (*proxy*) para o esforço de acasalamento dos machos. Esses resultados indicam que machos e fêmeas diferem em relação ao investimento em defesas, provavelmente porque as demandas para diferentes componentes de aptidão não são as mesmas em cada sexo. Adicionalmente, um maior investimento masculino em armamentos não parece comprometer severamente a produção de defesas químicas, ao contrário do que já foi registrado para defesas imunológicas em vertebrados e invertebrados. Aparentemente, os custos de manutenção e ativação do sistema imune em machos são superiores aos custos de produção e liberação de defesas químicas.

Coletivamente, os resultados obtidos nesta tese apontam que a produção de defesas químicas em opiliões é custosa e que está sujeita a demandas conflitantes com outros componentes de aptidão. Mais especificamente, o investimento em reprodução pelas fêmeas parece corresponder a um dreno importante de energia e recursos, que onera o investimento em defesas químicas. Em algumas espécies em que os machos cuidam dos ovos, o investimento em cuidado parental impede os indivíduos cuidadores de forragear e a restrição alimentar também pode ter efeitos negativos na produção de defesas químicas. Por fim, o maior investimento em acasalamento feito pelos machos implica no desenvolvimento e manutenção de estruturas supostamente custosas, tais como espinhos, tubérculos e a musculatura associada ao quarto par de pernas, comumente usado em brigas entre machos. O alto investimento masculino na busca por parceiras sexuais parece comprometer o investimento somático, tanto em imunidade quanto na produção de defesas químicas.

Ao mesmo tempo que muitas questões foram respondidas, várias outras questões ficaram em aberto e surgiram muitas oportunidades de estudos futuros. A partir dos resultados obtidos no capítulo 1, prevemos que o período de maior vulnerabilidade das fêmeas de *A. longipes* ocorre durante a produção de ovos. Tal previsão pode ser testada por meio de estudos de marcação-recaptura em campo.

Estudos prévios com diferentes espécies de opiliões já usaram procedimentos de marcação-recaptura para estimar a sobrevivência dos indivíduos e, portanto, o grupo oferece as condições ideais para avançar nosso conhecimento sobre as consequências das demandas conflitantes entre produção de ovos e produção de defesas químicas. Da mesma forma, seria possível usar estudos de marcação-recaptura para investigar se a mortalidade de machos cuidadores de *M. neptunus* é maior durante o período de cuidado parental. Finalmente, os resultados apresentados no capítulo 3 devem ser vistos como preliminares, pois mais espécies precisam ser incluídas na análise comparativa a fim de obtermos conclusões mais robustas. Já temos espécies-alvo bem estabelecidas e nosso plano é adicionar de quatro a seis espécies ao bando de dados antes da submissão do trabalho para a publicação. De qualquer forma, em seu estado atual, nosso trabalho aponta para um claro dimorfismo sexual na produção de defesas químicas que suscita duas questões básicas que deverão ser exploradas em mais detalhes no futuro: (1) Qual é a base mecanística (causa proximal) para o menor investimento dos machos em defesas químicas? (2) Quais são as consequências em termos de exposição à predação do menor investimento masculino em defesas químicas? Claramente, a investigação dos custos da produção de defesas químicas em artrópodes promete ser uma jornada tão estimulante quanto aquela trilhada por vários pesquisadores que investigaram seus benefícios. Esperamos, portanto, que os trabalhos apresentados aqui instiguem ecólogos químicos a investigar não apenas os benefícios, mas também custos associados às defesas químicas em animais.