



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**Pseudoescópula em *Ischnothele annulata* (Araneae, Mygalomorphae):
avaliando estrutura e funcionalidade na comunicação sexual**

JULIANA PANECZKO JURGILAS

Outubro - 2019



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**Pseudoescópula em *Ischnothele annulata* (Araneae, Mygalomorphae):
avaliando estrutura e funcionalidade na comunicação sexual**

JULIANA PANECZKO JURGILAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Meste em Zoologia.

Orientador: José Paulo Leite Guadanucci

**Rio Claro - SP
Outubro - 2019**

J95p

Jurgilas, Juliana Paneczko

Pseudoescópula em *Ischnothele annulata* (Araneae, Mygalomorphae): avaliando estrutura e funcionalidade na comunicação sexual / Juliana Paneczko Jurgilas. -- Rio Claro, 2019

66 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: José Paulo Leite Guadanucci

1. Zoologia. 2. Comunicação na biologia. 3. Feromonas. 4. Animais comportamento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

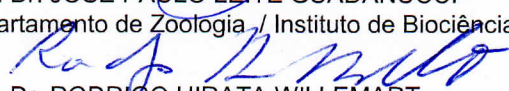
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Pseudoescópula em *Ischnothele annulata* (Araneae, Mygalomorphae): avaliando estrutura e funcionalidade na comunicação sexual

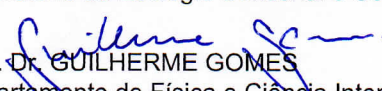
AUTORA: JULIANA PANECZKO JURGILAS

ORIENTADOR: JOSE PAULO LEITE GUADANUCCI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSE PAULO LEITE GUADANUCCI
Departamento de Zootologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. RODRIGO HIRATA WILLEMART
Laboratório de Ecologia Sensorial e Comportamento de Artrópodes / USP


Prof. Dr. GUILHERME GOMES
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / USP - Instituto de São Carlos / SP

Rio Claro, 28 de agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Zé Paulo, por aceitar orientar um projeto tão diferente da sua “zona de conforto”, mas fruto de um trabalho contínuo com as migalomorfas desde a graduação.

Aos meus pais, Paulo e Claudia, por todo o apoio durante essa jornada, pelo financiamento de parte das viagens de campo, e pela inestimável ajuda em campo. Uma salva de palmas especialmente à minha mãe, que apesar de sua fobia, colocou a mão na massa (mais especificamente na terra, e nas teias) e ajudou a capturar os indivíduos.

Ao meu companheiro, Matheus, pela sua valiosa contribuição em campo, e sua infinita paciência ao me ajudar na manutenção dos animais em cativeiro, principalmente no final do mestrado, quando a minha própria estava se esgotando. Agradeço também pela companhia, carinho, amor e incentivo que me dá todos os dias. Te amo!

À Mônica Iamonte e ao Antônio Yabuki, técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia (Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro), por terem me ensinado muito sobre o mundo da Microscopia Eletrônica.

Ao Dr. Peter Michalik, da Universidade de Greifswald. e ao Guilherme Gainett, por todas as dicas para o preparo das amostras e análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Profº Dr. José Maurício Simões Bento e à técnica Arodi Prado, do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pelo empréstimo dos equipamentos e reagentes necessários para a realização dos bioensaios, e pelo auxílio no estabelecimento das metodologias.

Ao Renato Salaroli, técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP, pela atenção e auxílio técnico durante as análises com o microscópio eletrônico de transmissão.

À Prof. Dra. Daiane Cristina Sass do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pela disponibilização dos reagentes para a realização de alguns dos bioensaios.

À Elis Marina Turini, pela atenção e auxílio com durante o processo de análise cromatográfica, se disponibilizando até aos finais de semana para me ajudar a realizar os testes!

Ao Vitor Marin, que me ajudou a pensar em alternativas para a extração dos compostos, e por toda ajuda durante as tentativas.

A todos os membros do Laboratório de Aracnologia de Rio Claro (LARC): Arthur, Giulia, Júlia, Maria, Rafael, Ton, Victor e Vivinha, pelas conversas, risadas, e pelo companheirismo. Estar acompanhada de pessoas prestativas, atenciosas, divertidas e gentis durante esses anos com certeza foi um fator determinante para realização de mais esta etapa acadêmica.

Ao Programa de pós-graduação (Zoologia) pelo despendimento de parte da verba PROAP aos alunos, o que me auxiliou a custear parte das viagens de campo durante o período em que eu ainda não dispunha de reserva técnica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo: nº 2018/00610-7, responsável pelo financiamento dos 9 meses de bolsa restantes e pela reserva técnica.

RESUMO

As aranhas geralmente são criaturas solitárias, de pouca acuidade visual, agressivas e potenciais predadoras canibais, características que podem ter selecionado formas de comunicação à longa distância, como sinais químicos e/ou vibratórios. Os feromônios são um exemplo de sinal utilizado durante a comunicação intersexual, já tendo sido caracterizado quimicamente para onze espécies de araneomorfos. A emissão dessas substâncias é feita pelas fêmeas por meio da seda ou pela cutícula. Para sua recepção, machos de araneomorfos utilizam cerdas quimiossensoriais presentes no dorso dos palpos. Para migalomorfos, foi reportada a presença de cerdas quimiossensoriais em um macho de *Idiops pylorus* a partir de análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Além disso, recentemente foi reportada a presença de uma cerda tarsal exclusiva de machos de Mygalomorphae, que por sua similaridade com as encontradas em *I. pylorus*, e até mesmo com as cerdas quimiossensoriais encontradas em araneomorfos, também foi considerada quimiossensorial, apesar da diferença de disposição entre as duas infraordens. Elas podem estar arranjadas de forma densa (sendo chamadas pseudoescópula), ou estarem esparsamente distribuídas juntamente com outros tipos de cerda. Estas cerdas também diferem de outras sensoriais que são amplamente encontradas em machos e fêmeas de migalomorfos.

No presente estudo, as cerdas da pseudoescópula de um representante de Mygalomorphae, *Ischnothele annulata*, foram investigadas por meio de bioensaios e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados indicam que os machos da espécie em questão se utilizam de sinais químicos presentes na teia das fêmeas (contato) para o reconhecimento intraespecífico, além de não utilizarem sinais de origem volátil (longo alcance) para encontrar as parceiras. As cerdas da pseudoescópula parecem ser as responsáveis pelo reconhecimento, uma vez que a obstrução dessas cerdas impede que os machos realizem movimentos de corte típicos da espécie quando entram em contato com a teia das fêmeas. As análises da cerda a partir de técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão também parecem indicar um padrão similar ao encontrado em cerdas quimiossensoriais de outros grupos de aranha.

Palavras-chave: comunicação química, ultraestrutura, feromônio.

ABSTRACT

Spiders are generally solitary, aggressive, potential cannibal predators, and have poor visual acuity. These features may have favored a strong selection for long-distance communication, such as chemical and/or vibratory signaling. The pheromone usage is an example of signal used during intersexual communication and have been chemically identified in eleven araneomorph species. To the emission of the pheromones, females can use their cuticle or web, and for the perception of these substances, araneomorph males use chemosensory setae located in the dorsal side of the pedipalps. In mygalomorphs, it was reported the presence of a chemosensory setae in an *Idiops pylorus* male, identified by Scanning Electron Microscopy micrographies. Besides that, recently it was reported a tarsal setae exclusive of mygalomorph males, that have been considered a chemosensory setae because of it's similarity with the one's found in *Idiops pylorus*, and even with the ones found in araneomorphs, despite the contrast in disposition of the setae between the infraorders. They can be arranged densely on tarsus, similar to those setae found in the scopula (and in this case, named pseudoscopula), or be sparsely distributed on ventral tarsus among other setae types. These male setae also differ from other chemosensory ones that are widespread in both males and females of mygalomorph spiders

In the present study, the pseudoscopula of a mygalomorph representative, *Ischnothele annulata*, was investigated through bioassays and transmission electron microscopy. The results indicate that the males identify the conspecific females by chemical signals present in the female silk (contact recognition), and that they do not use long range (volatile) signals to find a mate. The pseudoscopula setae seems to be accountable for the recognition, since the obstruction of the setae prevent males to react to the silk, failing to perform typical courtship when in contact with female's web. The transmission electronic microscopy analysis of the pseudoscopula seems to indicate a patter similar to those found in chemosensory setae of other group of spiders.

Keywords: chemical communication, ultrastructure, pheromone.

SUMÁRIO

Introdução.....	9
Objetivos gerais	12
Referências.....	13
CAPÍTULO I.....	16
ANÁLISE DE FUNCIONALIDADE DA PSEUDOESCÓPULA POR MEIO DE BIOENSAIOS COM UMA ARANHA <i>Ischnothele annulata</i> (Ischnothelidae)	16
Introdução.....	17
Objetivos	21
Material e Métodos.....	21
Coleta de exemplares e manutenção em cativeiro	21
Bioensaios	23
1. Presença/ausência de feromônios de contato (teste de teia/arena)	23
2. Extração de feromônios	24
3. Presença/ausência de feromônios voláteis (Olfatômetro)	26
4. Função da pseudoescópula (obstrução/remoção de cerdas)	28
Cromatografia gasosa aliada a Espectrometria de massa (GC-MS).....	30
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
Resultados	32
Discussão	45
Referências.....	50
CAPÍTULO II	54
ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CERDAS DA PSEUDOESCÓPULA EM UMA ARANHA <i>Ischnothele annulata</i> (Ischnothelidae)	54
Introdução.....	55
Objetivos	57
Material e Métodos.....	57
Protocolos para fixação, inclusão e contraste de material para MET	57
1) Epon Araldite – glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M.....	57
2) Spurr – glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M	58
3) Spurr – Karnovsky modificado	59
Receita química – Fixador Karnovsky modificado	60
Resultados e discussão.....	61
Referências.....	64

Introdução

As aranhas compreendem um grupo de animais abundantes e de alta diversidade, sendo a ordem Araneae o segundo grupo mais diverso entre os aracnídeos, perdendo apenas para os Acari (CODDINGTON, 2005). Atualmente, a ordem conta com mais de 48 mil espécies descritas e 117 famílias (WORLD SPIDER CATALOG, 2019), e está dividida em 3 infraordens: Liphistiomorphae, da subordem Mesothelae; e os grupos irmãos Mygalomorphae e Araneomorphae, ambos da subordem Opisthothelae (PLATNICK, GERTSCH, 1976). Com relação à sua origem, o exemplar mais antigo de aranha data do Devoniano médio, com cerca de 386 Milhões de anos (SELDEN *et al.*, 1991). Muito provavelmente, todas aranhas “primitivas” do Carbonífero eram Mesothelae por compartilharem traços plesiomórficos como 4 pulmões foliáceos e abdômen segmentado, enquanto as Opisthothelae são conhecidas desde o Triássico (FOELIX, 2011).

As Mesothelae, portanto, compreendem filogeneticamente o grupo de aranhas mais antigo, possuindo características consideradas primitivas (abdômen segmentado, 4 pulmões foliáceos, fiandeiras ventralmente localizadas e um par de fiandeiras médias anteriores) (CODDINGTON, 2005; FOELIX, 2011); enquanto que as Araneomorphae compreendem o grupo de aranhas mais derivado (CODDINGTON, 2005) e diverso, compreendendo 90% da diversidade da ordem (FOELIX, 2011). Elas possuem quelíceras verticais opostas uma à outra (labidognatha), e uma importante sinapomorfia do grupo é a fusão e redução das fiandeiras médias anteriores em uma estrutura chamada cribelo (CODDINGTON, 2005). Com relação à diversidade do grupo, elas dividem-se em 97 famílias (WORLD SPIDER CATALOG, 2019), e suas formas corporais são altamente modificadas quando comparadas com as Mygalomorphae (GOLOBOFF, 1993), assim como seus modos de vida. Elas podem ser cursoriais, ou viverem em tubos (Dysderidae) e detritos de folhas, ou até mesmo construírem teias elaboradas para captura de presas (Pholcidae) (CODDINGTON, 2005).

As Mygalomorphae, por sua vez, são um grupo de aranhas que apresentam características consideradas plesiomórficas como quelíceras “horizontais”, paralelas uma à outra (orthognatha), dois pares de pulmões foliáceos, coxas do palpo pouco diferenciadas e fiandeiras anteriores reduzidas (FOELIX, 2011), assemelhando-se mais às Mesothelae do que às Araneomorphae (CODDINGTON, 2005). Elas formam um grupo monofilético sustentado por uma série de características, como redução ou ausência das fiandeiras médias anteriores, redução ou ausência das fiandeiras laterais e presença de sigilas esternais (RAVEN, 1985), e estão distribuídas em 30 famílias, sendo 15 delas estabelecidas por Raven (1985), a 16ª reconhecida por Bond *et al.* (2012), e as demais reconhecidas recentemente em quatro

trabalhos: Godwin *et al.* (2018), Hedin *et al.* (2018), Hedin *et al.* (2019) e Opatova *et al.* (2019). Suas representantes, também chamadas de caranguejeiras (BATES, 1962) ou tarântulas (FOELIX, 2011), vivem uma vida reclusa em fendas ou “tubos” no substrato, mas outras formas de vida também são possíveis. Algumas espécies são arbóreas, construindo refúgios de teia em cascas de árvores (FOELIX, 2011), enquanto outras são aranhas de alçapão, e construtoras de teia em lençol (BOND *et al.*, 2012).

A condição de construtoras de teia em lençol pode ser encontrada em várias espécies de distintas famílias batesde migalomorfas (SHEAR, 1994), como por exemplo em alguns representantes de Nemesiidae e Cyrtaucheniidae (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017), e em Mecicobothriidae, Hexathelidae e Dipluridae, famílias em que seus representantes inclusive possuem fiandeiras laterais posteriores bem desenvolvidas (GRISMADO, GOLOBOFF, 2014), sendo um exemplo dessas características as *Ischnothele annulata* Tullgren, 1905. O gênero está distribuído pelas Antilhas, América Central e do Sul, e até recentemente, as *Ischnothele* sp. estavam inseridas na subfamília Ischnothelinae, dentro de Dipluridae (COYLE, 1995; BOND, 2012), uma família tida como não monofilética (GOLOBOFF, 1993; HEDIIN, BOND, 2006; WHEELER, 2017). No entanto, este ano foi sugerida uma nova classificação para estes indivíduos com base em dados moleculares, elevando o gênero ao nível de família, intitulada Ischnothelidae (OPATOVA *et al.*, 2019).

As *Ischnothele* sp. são indivíduos que contam com teias grandes, que partem de uma estrutura tubular que se abre à demais camadas superiores, que por sua vez se ancoram em uma grande porção do substrato, formando assim grandes estruturas tridimensionais interconectadas (Coyle, Ketner, 1990; Coyle, 1995). As teias servem à uma grande gama de funções para as aranhas, sendo um exemplo a captura de presas. Nesse caso, a teia funciona retardando o movimento das presas, ou acelerando a movimentação do predador, tanto no caso de teias “aéreas” quanto no caso em que há a deposição da teia no substrato. Ela também permite a localização das presas por meio das vibrações ocasionadas em fios de teia depositados de forma esparsa (SHEAR, 1994; CODDINGTON *et al.*, 2019). As teias também são usadas na dispersão, por meio do balonismo (COYLE, 1983), como forma de proteção, no caso de aranhas de funil e/ou alçapão, e na reprodução desses organismos.

Na reprodução, as teias são utilizadas para a construção da teia espermática e deposição do esperma, para a proteção dos ovos por meio da construção da ooteca, além de auxiliar no reconhecimento intraespecífico, ao serem utilizadas como meio de comunicação entre os indivíduos, a partir da transmissão de vibrações típicas da espécie, ou até mesmo por meio de substâncias químicas aderidas à ela. A troca de sinais químicos pode ter sido uma das mais

antigas formas de comunicação entre os aracnídeos (WEYGOLDT, 1977 apud FOELIX, 1985), e de fato, várias espécies utilizam as teias como forma de “emissão” de substâncias conhecidas como feromônios, que são nada mais que sinais químicos utilizados para transmitir informações entre indivíduos da mesma espécie (comunicação química), sendo o resultado de uma coevolução entre o receptor e o emissor da informação (GASKETT, 2007; FISCHER, 2019). A percepção dessas substâncias é feita por um tipo de cerda quimiossensorial localizado na região dorsal do pedipalpo dos machos, no caso de aranhas araneomorfas (TICHY *et al.*, 2001). Em migalomorfas, ainda não foi determinada a cerda responsável para a percepção destas substâncias. Alguns trabalhos sugerem a presença de cerdas quimiossensoriais em uma espécie de migalomorfa (um macho de *Idiops pylorus* Schwendinger, 1991) e em *Liphistius* sp., um gênero da infraordem Liphistiomorphae, tidas como sensoriais por apresentarem um poro subterminal na região apical e pela presença de dendritos em seu interior, verificados a partir de análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (FOELIX *et al.*, 2010).

Recentemente, Pérez-Miles *et al.* (2017) reportaram um novo tipo de cerda exclusiva de machos de migalomorfas, localizadas na região ventral do tarso. Elas podem arranjar-se densamente no tarso, de forma similar ao que ocorre com as cerdas da escópula (neste caso, denominadas pseudoescópula), ou estarem distribuídas de forma esparsa na região ventral do tarso entre outros tipos de cerdas. As cerdas da pseudoescópula muito assemelham-se às encontradas por Foelix *et al.* (2010, 2012) em machos de *Liphistius* sp. e *I. pylorus*, e, apesar da diferença de disposição, assemelham-se também com as cerdas quimiossensoriais reportadas para araneomorfas (RAMIRÉZ, 2014; BARTH, 1970, 2013 *apud* PÉREZ-MILES *et al.*, 2017), e, por isso, foram consideradas pelos autores como uma cerda quimiossensorial (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Além disso, essas cerdas exclusivas dos machos diferem de outras cerdas quimiossensoriais amplamente distribuídas em ambos machos e fêmeas de migalomorfas, que são mais compridas, finas e mais afuniladas (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017), ocorrendo na região ventral e dorsal do tarso, entre outras partes do corpo (GUADANUCCI, 2016).

A partir disso, é plausível assumir uma função quimiossensorial para as cerdas da pseudoescópula na biologia reprodutiva do grupo, devido à sua morfologia e presença exclusiva nos machos, sendo uma cerda adicional à comumente encontrada em ambos os sexos. No entanto, para que possamos inferir segurança a função de uma cerda, é necessária uma combinação de evidências oriundas de várias fontes diferentes. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar a forma de reconhecimento entre os indivíduos co-específicos de *Ischnothele annulata*, tentando avaliar a função da pseudoescópula neste processo por meio de bioensaios comportamentais, além da análise ultraestrutural desta estrutura (por Microscopia

Eletrônica de Transmissão e de Varredura). Esta espécie foi escolhida por ser abundante, por dispor de uma grande quantidade de teia, e possuir os tarsos cobertos majoritariamente por cerdas da pseudoescópula (sem possuir as cerdas adesivas da escópula), o que facilitaria a realização dos experimentos, minimizando a possibilidade de interferência por outros tipos de cerdas.

Objetivos gerais

1. Por meio de bioensaios: Investigar o reconhecimento entre machos e fêmeas co-específicas de *Ischnothele annulata*, tentando identificar o tipo de reconhecimento que ocorre nessa espécie (mecânico ou químico) e avaliar a função da pseudoescópula nesse processo
2. Identificar quimicamente os compostos responsáveis pelo reconhecimento
3. Analisar, por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) a ultraestrutura das cerdas da recém descrita “pseudoescópula”, procurando por evidências de atividade quimiorreceptora
4. Analisar, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o palpo de indivíduos jovens e adultos, a fim de verificar a existência de cerdas da quimiossensoriais neste órgão

Referências

- BARTH, F. G. Feinstruktur des Spinneninteguments. II. Die raumliche Anordnung der Mikrofasern in der lamellierten Cuticula und ihre Beziehung zur Gestalt der Porenkanäle (*Cupiennius salei* Keys., adult, hautungsfer, Tarsus). **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, 1970.
- BARTH, F. G. **Sinne und Verhalten**: aus dem Leben einer Spinne. Springer-Verlag, 2013.
- BATES, H. W. **The naturalist on the river Amazons**, 465 pp., illus. Map. University of California Press, Berkeley. 1962.
- BERTANI, R. 2001. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). *Arquivos de Zoologia*, v. 36, n. 3, p. 265-356, 2001.
- BOND, J. E. HENDRIXSON, B. E., HAMILTON, C. A. & HEDIN, M. A reconsideration of the classification of the spider infraorder Mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38753, 2012.
- CODDINGTON, J. A. Phylogeny and classification of spiders. Spiders of North America: an identification manual. **American Arachnological Society**, v. 377, p. 18-24, 2005.
- CODDINGTON, J.A., AGNARSSON, I., HAMILTON, C. A., BOND, J. E. Spiders did not repeatedly gain, but repeatedly lost, foraging webs. **PeerJ**, v. 7, p. e6703, 2019.
- COYLE, F. A. A revision of the funnelweb mygalomorph spider subfamily Ischnothelinae (Araneae, Dipluridae). **Bulletin of the American museum of natural history**; no. 226, 1995.
- COYLE, F. A. Aerial dispersal by mygalomorph spiderlings (Araneae, Mygalomorphae). **Journal of Arachnology**, p. 283-286, 1983.
- COYLE, F. A., KETNER, N. D. Observations on the prey and prey capture behaviour of the funnelweb mygalomorph spider genus *Ischnothele* (Araneae, Dipluridae). **Bulletin of the British Arachnological Society**, v. 8, n. 4, p. 97-104, 1990.
- FISCHER, A. Chemical communication in spiders—a methodological review. **The Journal of Arachnology**, v. 47, n. 1, p. 1-27, 2019.
- FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. Oxford University Press, New York. 2011.
- FOELIX, R. F. Mechano- and chemoreceptive sensilla. *In*: Neurobiology of arachnids. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 118-137, 1985.
- FOELIX, R. F.; ERB, B.; MICHALIK, P. Scopulate hairs in male *Liphistius* spiders: probable contact chemoreceptors. **Journal of Arachnology**, v. 38, n. 3, p. 599-603, 2010.
- FOELIX, R. F.; RAST, B.; PEATTIE, A. M. Silk secretion from tarantula feet revisited: alleged spigots are probably chemoreceptors. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 7, p. 1084-1089, 2012.

GASKETT, A. C. Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. **Biological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 27-48, 2007.

GODWIN, R. L., OPATOVA, V., GARRISON, N. L., HAMILTON, C. A., BOND, J. E. Phylogeny of a cosmopolitan family of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Ctenizidae) using Anchored Hybrid Enrichment, with a description of the family, Halonoproctidae Pocock 1901. **Molecular phylogenetics and evolution**, 126, 303-313, 2018.

GOLOBOFF, P. A. A reanalysis of mygalomorph spider families (Araneae). **American Museum novitates**; no. 3056. 1993.

GRISMADO, C.J., GOLOBOFF, P.A. Mecicobothriidae, Hexathelidae e Dipluridae. *In*: CLAPS, L. E.; ROIG-JUÑENT, S. A. **Biodiversidad de artrópodos argentinos**. 1a ed. San Miguel de Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Ciencias Naturales. v. 3, 546p. 2014.

GUADANUCCI, J.P.L.; JURGILAS, J. P.; INDICATTI, R.P.; MIGLIO, L.T. **Evolution of tarsal structures in Mygalomorphae**. *In*: International Congress of Archnology, 20., 2016, Golden. Program & Abstracts. Golden. Denver museum of nature & science reports, 2016. p.100.

HEDIN, M., BOND, J. E. Molecular phylogenetics of the spider infraorder Mygalomorphae using nuclear rRNA genes (18S and 28S): conflict and agreement with the current system of classification. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 41, n. 2, p. 454-471, 2006.

HEDIN, M., DERKARABETIAN, S., RAMÍREZ, M. J., VINK, C., BOND, J. E. Phylogenomic reclassification of the world's most venomous spiders (Mygalomorphae, Atracinae), with implications for venom evolution. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1636, 2018.

OPATOVA, V., HAMILTON, C. A., HEDIN, M., DE OCA, L. M., KRAL, J., BOND, J. E. Phylogenetic systematics and evolution of the spider infraorder Mygalomorphae using genomic scale data. **BioRxiv**, 531756, 2019.

PÉREZ-MILES, F.; GUADANUCCI, J.P.L.; JURGILAS, J. P.; BECCO, R.; PERAFÁN, C. Morphology and evolution of scopula, pseudoscopula and claw tufts in Mygalomorphae (Araneae). **Zoomorphology**, v. 136, n. 4, p. 435-459, 2017.

PLATNICK, N. I.; GERTSCH, W. J. The suborders of spiders: a cladistic analysis (Arachnida, Araneae). **American Museum novitates**; no. 2607. 1976.

RAMÍREZ, M. J. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae: Araneomorphae). **Bulletin of the american Museum of Natural History**, v. 2014, n. 390, p. 1-375, 2014.

RAVEN, R. J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): cladistics and systematics. **Bulletin of the American Museum of Natural History**; v. 182, article 1, 1985.

SELDEN, P. A., SHEAR, W. A., BONAMO, P. M. A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae. **Palaeontology** v. 34, pg. 241–281, 1991.

SHEAR, W. A. Untangling the evolution of the web. **American Scientist**, v. 82, p. 256-256, 1994.

TICHY, H.; GINGL, E.; EHN, R.; PAPKE, M.; SHULZ, S. Female sex pheromone of a wandering spider (*Cupiennius salei*): identification and sensory reception. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 187, n. 1, p. 75-78, 2001.

WEYGOLDT, P. **Communication in crustaceans and arachnids**. How animals communicate. Indiana University Press, Bloomington, p. 303-333, 1977.

WHEELER, W. C.; CODDINGTON, J. A.; CROWLEY, L. M.; DIMITROV, D., GOLOBOFF, P. A.; GRISWOLD, C. E.; HORMIGA, G.; PRENDINIA, L.; RAMÍREZ, M. J.; SIERWALDH, P.; ALMEIDA-SILVA, L.; ALVAZER-PADILLA, F.; ARNEDO, M. A.; SILVA, L. R. B.; BENJAMIN, S. P.; BOND, J.E.; GRISMADO, C.J.; HASAND, E.; HEDINN, M.; IZQUIERDO, M. A.; LABARQUE, F. M.; LEDFORD, J.; LOPARDO, L.; MADDISON, W.P.; MILLER, J. A.; PIACENTINI, L. N.; PLATNICK, N. I.; POLOTOW, D.; SILVA-DÁVILA, D.; SCHARFF, N.; SZÜTZ, T.; UBICK, D.; VINK, C.J.; WOOD, H. M.; ZHANG, J. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. **Cladistics**, v. 33, n. 6, p. 574-616, 2017.

WORLD SPIDER CATALOG (2019). World Spider Catalog. Versão 20.0. Natural History Museum Bern, online em: <http://wsc.nmbe.ch>, acessado em 24 de Maio de 2019. doi: 10.24436/2

CAPÍTULO I

**ANÁLISE DE FUNCIONALIDADE DA PSEUDOESCÓPULA POR MEIO DE
BIOENSAIOS COM UMA ARANHA *Ischnothele annulata* (Ischnothelidae)**

Introdução

Muitas aranhas caçadoras possuem, como definido por Foelix (2011), um "denso tufo de cerdas em suas pernas" denominado escópula, estrutura esta que tem sido utilizada em várias reconstruções filogenéticas (vide RAVEN, 1985; GOLOBOFF, 1993). Nas Mygalomorphae, especialmente, ela pode cobrir toda região ventral dos tarsos e metatarsos (FOELIX, 2011) e apresenta morfologia semelhante a uma escova ("broom-like"), pela presença de outras pequenas cerdas (microtrichias) no eixo principal (FOELIX, 2011; WOLF & GORB, 2012). Recentemente, Pérez-Miles *et al.* (2017) associaram a presença dessa estrutura principalmente com migalomorfas de hábitos cursoriais, caçadoras, e que vivem em tocas.

A escópula, composta por cerdas adesivas, possibilita que as aranhas caminhem verticalmente (e até mesmo de ponta-cabeça) sobre superfícies lisas, conferindo uma vantagem ao poderem caminhar de forma segura sobre rochas ou folhas, ambientes que de outra forma seriam inacessíveis (FOELIX, 2011). Experimentos mostram que essas cerdas conferem a habilidade de caminhar até mesmo em superfícies de vidro, e sua adesão é forte o suficiente para que (sob condições experimentais) um exemplar de *Cupiennius salei* (Keyserling, 1877) consiga suportar até 10 vezes o próprio peso quando colocado verticalmente em uma placa de vidro (FOELIX, 2011). Essa propriedade é explicada por forças de adesão física. Cada cerda da escópula possui milhares de microtrichias, que por sua vez terminam em uma estrutura em forma de espátula. A espátula é a responsável pelo contato da perna com o substrato, aumentando significativamente a superfície de contato (FOELIX, 2011; WOLF & GORB, 2012). As hipóteses da escópula como uma estrutura importante tanto na locomoção (HOMAN, 1957 *apud* ROVNER, 1980) quanto na captura de presas (FOELIX, CHU-WANG, 1975 *apud* ROVNER, 1980) já foram corroboradas a partir do estudo de Rovner (1980) com aranhas Lycosidae (Araneae), em que indivíduos sem escópula apresentaram menor sucesso na captura das presas.

Recentemente, Pérez-Miles *et al.* (2017) reportaram um novo tipo de cerda exclusiva de machos de migalomorfas, localizadas na região ventral do tarso. Elas são sub-cônicas, possuem estrias dispostas de forma oblíqua, e são mais grossas que as demais cerdas tarsais. Elas podem arranjar-se densamente no tarso, de forma similar ao que ocorre com as cerdas da escópula (neste caso, denominadas pseudoescópula), ou estarem distribuídas de forma esparsa na região ventral do tarso entre outros tipos de cerdas. Elas diferem das cerdas regulares da escópula por conta de sua propriedade não adesiva, inferida pela ausência de microtrichias (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Nota-se também a existência de uma gradação antero-posterior quanto à densidade

dessas cerdas: em algumas espécies a concentração é maior nas pernas anteriores (representantes de Cyrtaucheniidae, Nemesiidae, Theraphosidae, Barychelidae, Idiopidae e alguns diplurídeos da subfamília Diplurinae), enquanto em outras, nas posteriores (representantes de Actinopodidae, Paratropididae, Hexathelidae, e alguns outros diplurídeos das subfamílias Euagrinae e Ischnothelinae) (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Essa diferença também foi verificada nos machos de *Liphistius* sp. estudados por Foelix *et al.* (2010, 2012), em que a perna IV apresentou uma maior concentração dessas cerdas.

Wolff & Gorb (2012) afirmam que a morfologia específica das cerdas da escópula evoluiu em contextos diferentes, sob a influência do tamanho corporal e das adaptações aos diferentes nichos ecológicos, e que, dependendo das demandas ecológicas, etológicas, e de sua origem filogenética, ela pode ser altamente diversa nas várias espécies de aranhas. Essa informação é corroborada pelo estudo de Pérez-Miles *et al.* (2017), no qual os autores correlacionam a presença de pseudoescópula com o hábito não cursorial em várias famílias de Mygalomorphae, como Actinopodidae, Antrodiaetidae, Atypidae, Ctenizidae, Idiopidae, Migidae, Euctenizidae, Hexathelidae e alguns Dipluridae.

Algumas características geralmente encontradas em aranhas, como a forma de vida solitária, agressividade, visão precária, e o potencial para serem predadoras canibais, podem ter favorecido uma forte seleção para formas de comunicação à longa distância neste grupo, como a comunicação química (TICHY, 2001; GASKETT, 2007). De fato, a fim de evitar comportamentos agonísticos por parte das fêmeas (como agressividade/canibalismo), os machos utilizam-se de várias estratégias, evitando assim o contato entre o emissor e o receptor da informação. Podemos citar como exemplo o uso de sinais visuais e acústicos/vibratórios, e os sinais e/ou pistas químicas, que podem ser utilizados durante e/ou previamente à corte (UETZ, STRATTON, 1983; GASKETT, 2007; FOELIX, 2011).

No que se refere à comunicação química, dependendo da função e contexto em que ela se dá, podemos dividi-la em diferentes categorias. As pistas químicas são primariamente utilizadas por um receptor, que reage de uma forma específica ao emissor (ou que obtém informações sobre ele), sem que este tenha a intenção de causar uma resposta. Já os sinais químicos, por sua vez, são uma forma de comunicação que coevoluiu entre o emissor e o receptor da informação. Como exemplos de sinais químicos, podemos citar os Aleloquímicos (Alomônios, Cairomônios e Sinomônios), utilizados para transmitir informações entre espécies diferentes, e, alternativamente, os feromônios, que são uma forma de transferir informações entre indivíduos da mesma espécie, e que trazem, normalmente, respostas mutualmente benéficas (GASKETT, 2007; FISCHER, 2019).

No que se refere às aranhas, vários são os estudos comportamentais e químicos que mostram que o uso de feromônios é comum neste grupo (PAPKE *et al.*, 2000, 2001; TICHY, 2001; GASKETT, 2007; BARUFFALDI *et al.*, 2010; SCHULZ, 2013), apesar de terem sido identificados conclusivamente em apenas onze espécies de araneomorfos: *Linyphia triangularis* (Clerck, 1757), *Linyphia montana* (Linnaeus, 1758) e *Linyphia tenuipalpis* Simon, 1884 (Linyphiidae), *Cupiennius salei* (Keyserling, 1877) (Ctenidae), *Agelenopsis aperta* (Gertsch, 1934) (Agelenidae), *Argiope bruennichi* (Scopoli, 1772) (Araneidae), *Pholcus beijingensis* (Pholcidae), *Latrodectus hasselti* Thorell, 1870, *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841, *Latrodectus hesperus* Chamberlin & Ivie, 1935 (Theridiidae) e *Eratigena atrica* (C. L. Koch, 1843) (Agelenidae), de acordo com Fischer (2019).

Feromônios sexuais geralmente são emitidos por fêmeas e percebido pelos machos, apesar de existirem exceções. No caso da emissão dos feromônios, as fêmeas podem se utilizar da cutícula ou da teia para esta tarefa (TRABALON, 2010), sendo que as emissões por meio da teia são mais reportadas e estudadas do que as feitas a partir da cutícula (GASKETT, 2007). Para a captação dessas substâncias, Gaskett (2007) sugeriu em sua revisão que quimiorreceptores nos machos estariam localizados provavelmente nos pedipalpos ou no tarso das pernas dianteiras. Essa inferência foi feita por conta de um comportamento comum que vários machos apresentam, que é o de manipular a teia da fêmea utilizando os palpos ou pernas dianteiras durante a corte, comportamento também observado em migalomorfos (GASKETT, 2007; FERRETTI, 2013).

De fato, as supostas cerdas responsáveis pela recepção dos feromônios foram descritas para duas espécies de araneomorfos, *Cupiennius salei* (Ctenidae) e *Latrodectus hesperus* Chamberlin & Ivie, 1935 (Theridiidae), sendo que as cerdas de *C. salei* encontram-se na região dorsal do pedipalpo do macho, e são comprovadamente quimiossensíveis (TICHY *et al.*, 2001), enquanto que as cerdas de *L. hesperus* encontram-se distribuídas em todos os segmentos tarsais, e na região ventral dos palpos de ambos os sexos. Sua função quimiossensorial, por outro lado, foi inferida apenas por sua morfologia (ROSS, SMITH, 1979). Em migalomorfos, ainda não foi determinada a cerda responsável para a percepção destas substâncias. Apenas alguns trabalhos sugerem a presença de cerdas quimiossensoriais em uma espécie de migalomorfo (um macho de *Idiops pylorus* Schwendinger, 1991) e em *Liphistius* sp., um gênero da infraordem Liphistiomorphae, tidas como sensoriais por apresentarem um poro subterminal na região apical e pela presença de dendritos em seu interior, verificados a partir de análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (FOELIX *et al.*, 2010).

As cerdas da pseudoescópula muito assemelham-se (ultramorfologicamente) a estas cerdas encontradas por Foelix *et al.* (2010, 2012) em machos de *Liphistius* sp. e *I. pylorus*, e, apesar da diferença de disposição, assemelham-se também às cerdas quimiossensoriais reportadas para areneomorfos (RAMIRÉZ, 2014; BARTH, 1970, 2013 *apud* PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Por essa razão, foram consideradas pelos autores como uma cerda quimiossensorial (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Além disso, essas cerdas exclusivas dos machos diferem de outras cerdas quimiossensoriais amplamente distribuídas em ambos machos e fêmeas de migalomorfos, que são mais compridas, finas e mais afuniladas (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017), e que ocorrem tanto na região ventral quanto dorsal do tarso, entre outras partes do corpo (GUADANUCCI, 2016). A partir disso, é plausível assumir uma função quimiossensorial para as cerdas da pseudoescópula na biologia reprodutiva do grupo, devido à sua morfologia e presença exclusiva nos machos, sendo uma cerda adicional à comumente encontrada em ambos os sexos.

No entanto, para que possamos inferir com confiança a função de uma sensilla, e estabelecer o tipo de comunicação utilizado por uma espécie, é necessária a utilização de evidências provenientes de metodologias variadas, sendo alguns exemplos: evidências morfológicas da função de uma cerda, sendo elas ultraestruturais ou ultramorfológicas (FOELIX, CHU-WANG, 1973a, b; FOELIX *et al.*, 2010); testes eletrofisiológicos (TICHY *et al.*, 2001), que ajudam a estabelecer se existe uma reação do organismo quando uma cerda em questão é exposta a um determinado estímulo; a caracterização de compostos como por exemplo feromônios, no caso em que haja comunicação química (SCHULZ, TOFT, 1993; PAPKE *et al.*, 2000; SCOTT, 2015); além de experimentos comportamentais, que dão indícios do tipo de comunicação realizado entre os indivíduos.

Os experimentos comportamentais devem ser uma medida confiável do comportamento que se está tentando acessar (WYATT, 2014). Por isso, além das evidências circunstanciais reunidas a partir de observações do comportamento dos machos ao entrar em contato com a teia das fêmeas ao acaso, ou em experimentos de acasalamento simulados em laboratório, evidências mais convincentes do uso de feromônios sexuais tem sido reunidas em experimentos controlados, expondo os indivíduos a fios de teia, ou extratos de teia/cutícula (GASKETT, 2007). Outros experimentos possíveis para estabelecer a função e o papel dos feromônios nas estratégias de acasalamento são a utilização de testes de escolha, onde os indivíduos são expostos a mais de um tipo de sinal de forma simultânea, utilizando-se de olfatômetro, ou então por meio de testes em uma grande arena (ROBERTS, UETZ 2004 a,b, 2005).

Para medir a resposta dos machos a determinado estímulo, é possível utilizar alguns comportamentos desses indivíduos quando em contato com o estímulo, como por exemplo, machos de *Linyphia triangularis*, que, ao entrar em contato com a teia das fêmeas sexualmente maduras, cortam estes fios (SCHULZ, TOFT, 1993). Outro exemplo são os comportamentos típicos de corte, como no caso de machos de *Cupiennius salei*, que ao entrarem em contato com as teias das fêmeas co-específicas, emitem vibrações típicas da corte dessa espécie (TICHY, 2001). Em experimentos de escolha, a primeira, a última escolha, ou então o tempo em que os machos permanecem próximos ao estímulo são uma maneira de acessar a preferência desses indivíduos (UETZ, 2004b; GASKETT, 2007).

A partir deste cenário, o presente capítulo tem como objetivo investigar o tipo de comunicação utilizado por indivíduos de *Ischnothele annulata*, tentando identificar como ocorre o reconhecimento entre macho e fêmeas co-específicas, e avaliar a função das cerdas da pseudoescópula neste reconhecimento por meio de bioensaios, além da realização de análises morfológicas dos palpos de machos, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Objetivos

O presente capítulo tem como objetivo:

1. Investigar o reconhecimento químico entre machos e fêmeas co-específicas de *Ischnothele annulata*, tentando identificar o tipo de reconhecimento que ocorre nessa espécie (reconhecimento mecânico ou químico? Se químico, por contato ou por substâncias voláteis?)
2. Identificar quimicamente os compostos responsáveis pelo reconhecimento
3. Avaliar a função da pseudoescópula no reconhecimento intraespecífico
4. Analisar, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o palpo de indivíduos jovens e adultos, a fim de verificar a existência de cerdas quimiossensoriais neste órgão

Material e Métodos

Coleta de exemplares e manutenção em cativeiro

Os exemplares de *Ischnothele annulata* utilizados neste trabalho foram coletados em Pirenópolis (GO) e Ituiutaba (MG) durante três viagens de campo em períodos diferentes. O

primeiro campo, em Pirenópolis, ocorreu entre os dias 18 e 19 de novembro de 2017, resultando na coleta de 45 indivíduos adultos (maduros sexualmente), e algumas ootecas encontradas juntamente com os indivíduos adultos. O segundo ocorreu em Ituiutaba no dia 17 de março de 2018, resultando na coleta de 42 indivíduos adultos; e o terceiro, novamente em Pirenópolis, no dia 14 de julho de 2018, resultou na coleta de 127 indivíduos jovens. Também foram utilizados alguns filhotes que já se encontravam em cativeiro no Laboratório de Aracnologia de Rio Claro (LARC) antes do início deste trabalho, eclodidos aproximadamente em 05 de Janeiro de 2017; e alguns filhotes das ootecas coletadas durante a segunda viagem de campo à Pirenópolis.

Indivíduos coletados em Ituiutaba foram encontrados principalmente em áreas particulares (fazendas e condomínios residenciais fechados), próximos a entulhos, ou debaixo de pedras e outros materiais que pudessem oferecer abrigo. O acesso a esses locais foi possível por meio do auxílio da equipe do Centro de Controle de Zoonoses. Já os coletados em Pirenópolis foram encontrados próximos a estradas (fig. 1 e 2) margeando vegetação típica de cerrado, ou pasto. Em ambos os casos, esses indivíduos apresentavam teias grandes, facilmente avistáveis, ancoradas em barrancos (fig. 3), ou em cupinzeiros dispostos na vegetação (fig. 4).

Após a coleta, os exemplares foram mantidos individualmente em potes de plástico de 500 ml (12 cm x 8 cm altura) contendo terra vegetal e alimentados de uma a duas vezes por semana (adultos e jovens, respectivamente) ou com ninfas de grilos (*Gryllus assimilis*), baratas (*Phoetalia pallida* ou *Nauphoeta cinérea*) ou larvas de besouro (*Tenebrio molitor*).



Figura 1-4. Coleta de exemplares em Pirenópolis (GO). 1,2. Estrada onde estavam localizados os exemplares. 3. Teia ancorada em barranco. 4. Teia ancorada em cupinzeiro.

Bioensaios

Os Bioensaios descritos a seguir foram realizados na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Rio Claro. Indivíduos coletados na fase adulta (maduros sexualmente) foram considerados não virgens, e indivíduos que atingiram a fase adulta em laboratório, tendo sido coletados na fase jovem (imaturos sexualmente) e os nascidos em cativeiro, foram considerados virgens. Indivíduos adultos (não virgens) apenas foram utilizados nos experimentos preliminares com olfatômetro; todos os demais experimentos foram utilizados com indivíduos adultos virgens. Exames individuais em Estereomicroscópio foram utilizados para verificar a maturidade sexual dos indivíduos, além de um teste comportamental preliminar (teste de teia), descrito abaixo.

1. Presença/ausência de feromônios de contato (teste de teia/arena)

A fim de investigar se a teia dos indivíduos desencadeava comportamentos de corte nos machos, dois experimentos foram realizados. No primeiro, intitulado teste de teia, fêmeas virgens tiveram suas teias removidas dos potes onde eram mantidas, e foram deixadas por 24 a 48 horas construindo uma nova teia. Após esse período, machos virgens sexualmente maduros eram imediatamente colocados diretamente em cima das teias das fêmeas virgens, e seus comportamentos observados por até 10 minutos (fig. 5). O comportamento típico de corte dos machos foi utilizado para medir sua resposta em relação à teia das fêmeas (PAPKE *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2009; BARUFFALDI *et al.*, 2010; SCOTT *et al.*, 2015). A teia era considerada atrativa se os machos apresentassem, dentro desses 10 minutos, comportamentos característicos de corte como: vibrações do corpo (*Body vibration* - BV) e tamborilar de palpos na teia (*pupal drumming* - PD) (GHIROTTI, 2017). Quando os machos apenas caminhavam na teia, entravam na teia em direção ao substrato, ou não se moviam durante todo o período, a teia era considerada não atrativa. Os testes com resposta positiva por parte dos machos foram tabelados, e foi calculada a média e mediana do tempo que os machos demoravam para iniciar os movimentos de corte depois de inseridos na teia da fêmea (tempo de latência); sendo divididos em experimentos com, e sem a presença da fêmea nos potes. Os testes de teia foram repetidos no início de todos os demais experimentos, e os resultados positivos encontrados também foram considerados neste cálculo; dessa forma, cada macho foi testado mais de uma vez, já que os casais testados eram escolhidos de forma aleatória.

No segundo experimento, fêmeas virgens foram inseridas em potes plásticos limpos, que por sua vez foram enterrados em arenas com terra vegetal (fig. 6). Os potes eram enterrados

de forma que a borda dos potes ficasse exatamente no nível da terra. Um pote maior era deixado de cabeça pra baixo tampando toda borda do pote enterrado, e mais uma pequena porção de terra ao redor do pote enterrado. Assim, quando deixadas para fazer teia por 24-48 horas, as fêmeas conseguiam preencher de teia todo o pote enterrado, assim como a terra que margeava o pote. No momento do experimento, o pote grande era removido, deixando-se então a teia circundando a terra ao redor do pote enterrado, e o macho era inserido no lado oposto da arena, e seu comportamento observado por cerca de 30 minutos, ou até os machos encontrarem a teia das fêmeas. O experimento tinha como objetivo verificar se os machos encontrariam as fêmeas por “acaso”, ao explorarem o recinto, ou se seriam atraídos por substâncias voláteis, sendo direcionados para o lado em que se encontravam as fêmeas.

Ambos experimentos foram realizados entre 10 e 18hrs, com luz artificial, em uma sala separada do restante dos indivíduos mantidos em cativeiro.

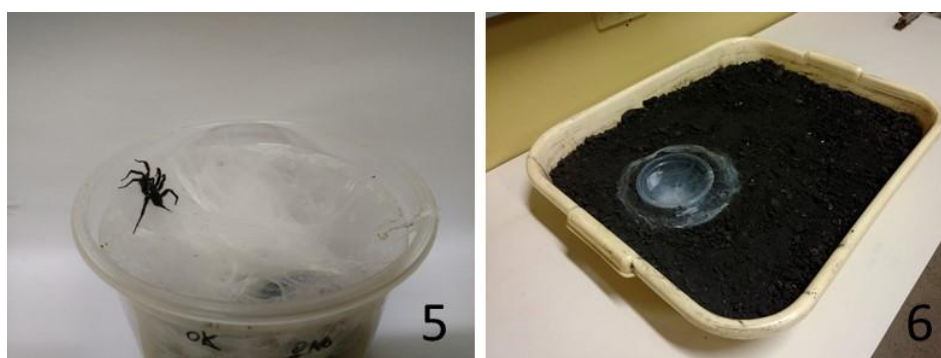


Figura 5-6. Bioensaios de feromônios de contato. 5. Teste de teia. 6. Teste de arena.

2. Extração de feromônios

Afim de testar a hipótese da existência de feromônios de contato depositados na teia das fêmeas, este experimento consistiu em extrair possíveis compostos da teia das fêmeas com solvente, e testar a resposta dos machos co-específicos a este extrato em um meio inerte (PAPKE, 2000; XIAO *et al.*, 2009; BARUFFALDI *et al.*, 2010; SCOTT *et al.*, 2015).

Fêmeas virgens que se mostraram atrativas aos machos virgens em novos testes de teia preliminares foram selecionadas, colocadas em potes de plástico limpos, e deixadas tempo o suficiente para completarem o pote com nova teia (de 2 a 4 dias). Após esse período, as teias foram removidas dos potes e colocadas em *vials* de vidro (fig. 8) com volumes de solvente que variaram de 100 a 300 μ l. A metodologia para a inserção da teia nos solventes variou entre: colocar a teia diretamente no solvente com a ajuda de estilete metálico e espátula, enrolar a teia

em um capilar de vidro e submergir a ponta do capilar no solvente (conforme BARUFFALDI *et al.*, 2010), e macerar a teia no solvente por 3-5 minutos antes de colocá-la no *vial*.

A teia foi então deixada no solvente por cerca de 3 a 4 horas, e, após esse período, o extrato foi coletado com micropipeta e despejado em um papel filtro ou gaze (figs. 9 e 10), disposto em placa de Petri. O solvente foi deixado para secar naturalmente no meio (aproximadamente 15 minutos). Após a secagem completa, o macho foi inserido na placa, e seu comportamento observado por 10 minutos, a fim de verificar se eles apresentariam comportamentos típicos de corte ao entrarem em contato com os extratos de teia. Após o experimento, novos testes de teia foram realizados entre os casais testados, com teias recém-feitas pelas fêmeas após o período de extração, a fim de verificar se naquele dia os machos apresentariam uma resposta positiva à teia das fêmeas.

Solventes de diferentes polaridades foram testados, assim como o tempo em que as teias eram deixadas no solvente. Foi dada uma maior ênfase para o solvente polar Metanol, por ter se mostrado eficiente para extração em trabalhos com feromônios de contato depositados nas teias (SCHULZ, TOFT, 1993; PAPKE *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 2015), assim como água destilada (BARUFFALDI, 2010). O experimento foi realizado entre 13 e 19hrs, com luz artificial, em uma sala separada do restante dos indivíduos mantidos em cativeiro. Os machos não eram testados mais de uma vez no mesmo dia, sendo a única exceção o macho 310, que foi testado com duas fêmeas no mesmo dia (08/out).

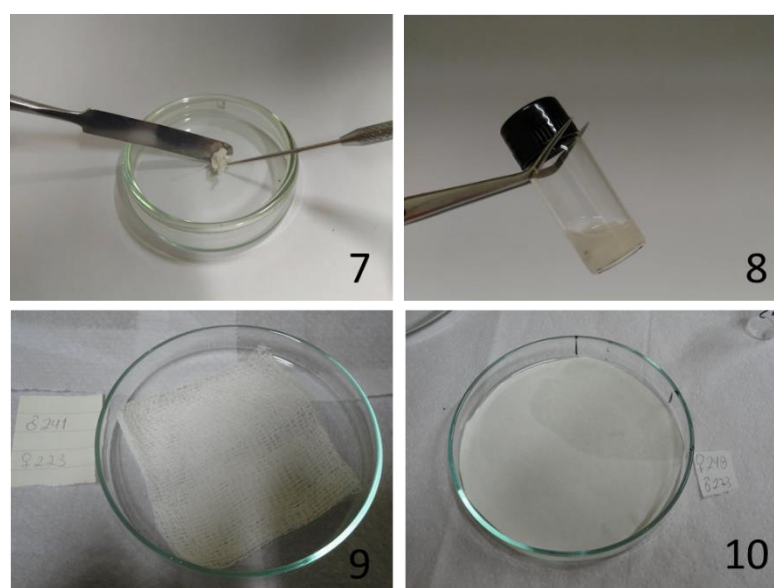


Figura 7-10. Bioensaios de extração de feromônios. 7. Coleta da teia. 8. Vial contendo teia e solvente para extração. 9-10. Substrato para inserção do extrato de teia, gaze (esq.) e papel filtro (dir.).

3. Presença/ausência de feromônios voláteis (Olfatômetro)

O olfatômetro (esquema 1) é um dispositivo tubular de vidro em forma de Y onde é possível acoplar (por meio de conectores) uma bomba de ar de forma a criar um fluxo dentro do aparelho, permitindo a passagem de substâncias voláteis como por exemplo, feromônios. Em cada braço do equipamento é possível também acoplar potes, onde podem ser inseridos diferentes tipos de tratamento, oferecendo assim duas opções para o indivíduo que é colocado no equipamento. O uso do olfatômetro, neste experimento, teve como objetivo verificar se os machos, quando inseridos na entrada do tubo, conseguiriam encontrar as fêmeas por meio de pistas olfativas carregadas pela corrente de ar.

O experimento consistiu em dispor machos virgens de *Ischnothele annulata* em um olfatômetro (fig. 11) e observar a escolha dos indivíduos, que podia alternar entre o lado onde se encontra o tratamento, ou o lado controle. Nesse trabalho, optamos por inserir uma bomba à vácuo na base do equipamento, criando então um fluxo de ar a partir dos braços em direção à base do equipamento. Também por meio de conectores foi possível acoplar um pote de plástico em cada braço do equipamento (tratamento e controle). O controle consistiu no pote plástico vazio, enquanto o lado do tratamento consistiu na fêmea virgem juntamente com a teia construída neste recinto 48 horas antes do início do experimento (fig. 12). O tempo foi estabelecido para que houvesse uma quantidade considerável de teia depositada no recipiente para a realização do experimento. A atratividade das fêmeas foi verificada por meio de novos testes de teia, que foram realizados antes ou depois do experimento (tabela 5).

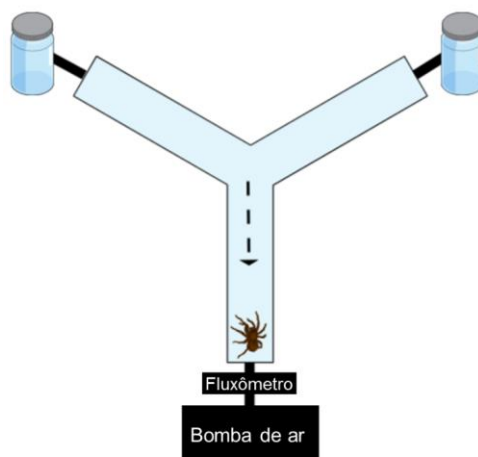
Antes do início dos experimentos o equipamento foi lavado para a remoção de qualquer vestígio de outras substâncias que pudessem estar presentes no vidro. A lavagem foi feita com água e detergente Extran (Merk), seguido pelo enxague com água da torneira e água destilada. Em seguida, o material foi mantido em estufa a 170°C por duas horas. Depois desse período, o equipamento foi borrifado internamente com acetona P.A. (LS Chemicals) e suas entradas seladas com alumínio. No início do experimento, os potes do grupo controle e tratamento foram conectados ao equipamento, e o macho, inserido em sua base (fig. 13 e 14). Após a inserção do indivíduo e posterior acoplamento do conector, foi dado um período de aclimação (SEARCY, 1999) de cerca de 3 minutos dentro do equipamento. Após esse período a bomba de ar foi ligada, e o comportamento do indivíduo foi observado por 15 minutos. A escolha dos machos era definida uma vez que eles atravessassem mais da metade de um dos braços do equipamento.

Entre cada teste, o macho era retirado, e o equipamento era limpo com acetona P.A. Se houvesse deposição de seda no tubo, o equipamento era lavado completamente (detergente,

água de torneira e destilada, colocado em estufa até o completo secamento, e borrifado com acetona). Uma mesma fêmea foi testada com dois machos diferentes, e a cada troca de macho, os tratamentos foram trocados de lado, a fim de evitar efeitos de lateralidade (PUNZO, 2005). O experimento foi realizado entre 11 e 21hrs, com luz artificial, em uma sala separada do restante dos indivíduos mantidos em cativeiro. No dia 27 de novembro, a janela de horário foi das 15 às 21:30hrs, e no dia 28 de novembro, das 11 às 19hrs. O experimento foi realizado no mesmo período em que foram observadas respostas positivas durante os testes de teia

Para minimizar os efeitos da vibração da bomba de ar, esta foi disposta em uma pequena mesa à parte da que se encontrava o olfatômetro, com uma camada de E.V.A. entre as pernas da mesa e o chão. O tubo por onde o ar chegava até os conectores foi disposto de forma a não encostar na mesa em que estava disposto o olfatômetro. Para minimizar a influência de pistas visuais, o olfatômetro foi disposto em cima de uma camada de E.V.A preto, deixando toda a parte de baixo do aparelho de uma mesma cor uniforme.

O experimento foi realizado em parceria com Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), por meio do empréstimo dos equipamentos utilizados descritos acima (olfatômetro, bomba à vácuo e fluxômetro), e pelo treinamento para a realização dos experimentos (metodologia de lavagem do equipamento, assim como montagem e efetivação do experimento). Em janeiro de 2018, três testes preliminares foram realizados: um no Lab. de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, e um na UNESP (Rio Claro), com poucos indivíduos adultos não virgens. Também foram realizados testes adicionais com a utilização de bombas de aquário acopladas aos dois braços do equipamento, criando então um fluxo de ar a partir dos braços em direção à base do equipamento. Apenas neste teste não foi possível utilizar o fluxômetro; consequentemente, o fluxo de ar nesse teste não foi medido. Estes testes foram importantes para o estabelecimento final da metodologia citada acima, permitindo estabelecer o fluxo de ar a ser usado, entre outros aspectos.



Esquema 1. Panorama geral do olfatômetro: macho inserido na base, potes experimentais acoplados nos braços direito e esquerdo, e bomba de ar acoplada na base do equipamento, juntamente com o fluxômetro.

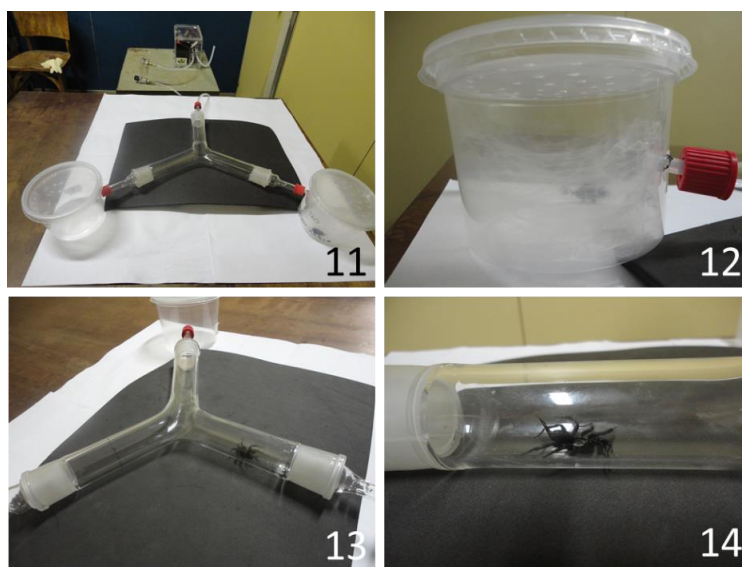


Figura 11-14. Bioensaios com Olfatômetro. 11. Disposição do equipamento. 12. Exemplo de pote utilizado no experimento como tratamento (fêmea e sua teia). 13. Macho inserido na base, e visão geral do equipamento. 14. Em detalhe, macho inserido na base do equipamento.

4. Função da pseudoescópula (obstrução/remoção de cerdas)

Este experimento foi realizado de forma a testar a hipótese de que as cerdas da pseudoescópula presentes nos machos seriam as responsáveis pelo reconhecimento co-específico, por meio do contato com a teia das fêmeas. Para tanto, estas cerdas foram removidas ou obstruídas, com o intuito de verificar se a ausência dessas cerdas impossibilitaria o reconhecimento entre machos e fêmeas virgens e adultos, dando indícios de sua funcionalidade na reprodução dessa espécie.

Antes do experimento, fêmeas virgens tiveram suas teias removidas dos potes onde eram mantidas, e um período de 24 horas foi estabelecido para que fizessem novas teias. Após esse período, a fêmea era cuidadosamente removida da teia, de forma a não deformar sua estrutura, e um macho era inserido imediatamente nessa teia. Ao ser constatada a atratividade da teia por meio de comportamentos de corte (*body vibration* e *papal drumming*) do macho (também virgem), esse macho e essa fêmea eram estabelecidos como um casal “compatível”, e esse mesmo casal era utilizado nas próximas etapas do experimento. O macho do casal era então removido da teia da fêmea, e passava imediatamente pelos procedimentos de tratamento (remoção ou obstrução das cerdas).

Após o tratamento, os machos eram imediatamente inseridos novamente na teia da fêmea, e seu comportamento, observado. Se os machos efetuassem comportamentos de autolimpeza, andassem na teia ou qualquer outro movimento que não os típicos de corte realizados após o contato com a teia das fêmeas, as cerdas da pseudoescópula seriam consideradas as prováveis responsáveis pelo reconhecimento da teia. Se os machos continuassem a cortejar a teia mesmo após o procedimento, a hipótese de que a pseudoescópula seria a responsável pelo reconhecimento da teia seria refutada.

Cada casal (macho e fêmea compatíveis) foi utilizado uma única vez em um grupo e tratamento específico; portanto, nenhum indivíduo foi testado mais de uma vez, e machos de ambos os grupos (controle e tratamento) foram sedados e manipulados de forma igual antes do experimento.

A manipulação consistia em anestesiá-los com auxílio de CO₂ gasoso (fig. 17) dentro de uma câmara de plástico ligada ao cilindro de gás; em seguida depositá-los em uma esponja de cozinha e imobilizá-los com auxílio de gaze, passando-a por cima de todo o corpo do animal (fig. 15), e deixando que as pernas trespassassem os fios, de modo que fosse possível manipular a região de interesse (tarsos e metatarsos).

Os tratamentos de remoção consistiam em remover as cerdas com auxílio de uma agulha de insulina (BD Ultra-Fine™100U) (fig. 16). Já os tratamentos de obstrução consistiam em obstruir as cerdas com o auxílio de materiais como vaselina, Dimetilsulfóxido (DMSO), ou parafina. O DMSO já havia sido utilizado em *Coptotermes formosanus* (Isoptera) por Park *et al.* (2004) para cobrir segmentos na região lateral do abdômen, onde estão localizadas cerdas que estariam relacionadas com o reconhecimento da fêmea pelos machos. Nesse estudo supracitado, o tratamento com DMSO mostrou-se eficaz ao bloquear o reconhecimento, impedindo o comportamento de tandem nessa espécie de térmita.

Também foram realizados 3 tratamentos controle, com o intuito de verificar se a manipulação dos indivíduos (anestesia e remoção ou obstrução das cerdas) afetaria o comportamento de corte. Para tanto, os machos foram anestesiados com CO₂ da mesma forma que o grupo experimental (descrito acima), e os seguintes experimentos controle foram testados: 1) remoção das cerdas ventrais do metatarso, 2) obstrução (com vaselina) das cerdas dorsais do tarso, e 3) obstrução (com vaselina) das cerdas ventrais do metatarso.

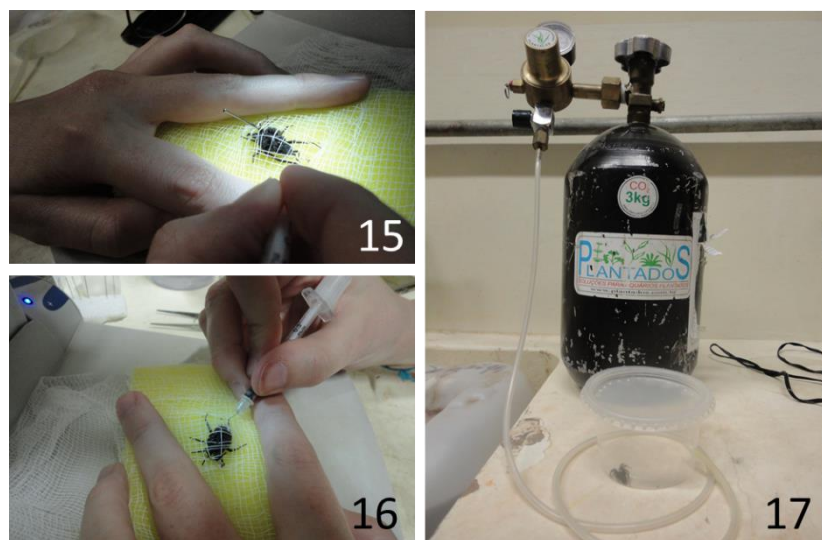


Figura 15-17. Bioensaios de remoção/obstrução das cerdas da pseudoescópula. 15. Indivíduo imobilizado com gaze, em esponja. 16. Remoção das cerdas com auxílio de seringa. 17. Pote acoplado ao cilindro de CO₂, utilizado para anestesiá-los os indivíduos.

Cromatografia gasosa aliada a Espectrometria de massa (GC-MS)

A fim de tentar identificar possíveis compostos presentes nas teias das fêmeas que possibilitassem seu reconhecimento pelos machos co-específicos, extratos de teia foram utilizados para análise em GC-MS (SCHULZ, TOFT, 1993; PAPKE *et al.*, 2000; SCOTT, 2015), conforme a metodologia descrita abaixo.

Fêmeas virgens que se mostraram atrativas aos machos em testes de teia preliminares foram selecionadas, colocadas em potes de plástico limpos, e lá deixadas para fazerem novas teias. Em seguida, as teias foram removidas dos potes com auxílio de estilete metálico e inseridas em vials específicos para análise em GC-MS, juntamente com o solvente para extração dos feromônios.

As análises foram feitas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS/MS - Waters). Nas duas primeiras (em 26 e 29 de novembro de 2018), os machos e fêmeas foram deixados fazendo teia por 2 e 3 dias, respectivamente. Para a extração,

as teias foram colocadas em vials com 1000 µl (1ml) de solvente (Metanol e Ethyl acetato), onde permaneceram por 24 horas. Foram analisadas 5 amostras (uma amostra composta por teias de três fêmeas, uma amostra composta por teias de duas fêmeas, duas amostras compostas por uma única teia de fêmea, e uma amostra composta por teias de três machos). A metodologia de injeção foi baseada na descrita em XIAO, Y. *et al.* (2009). O gás utilizado como carreador foi o Hélio, em fluxo constante de 2,0 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor (inicial) foi de 280°C. O volume de 1 µl de solvente foi injetado no modo *splitless*. A temperatura foi programada para ir de 80°C a 240°C, sendo o aumento de 5°C/min. Após, a temperatura aumenta em 10°C/min até 280°C, sendo mantida por 10 minutos.

Na terceira análise (em 02 de dezembro de 2018), machos e fêmeas foram deixados fazendo teia por 3 dias, e suas teias colocadas em vials com 1000 µl (1ml) de solvente (Metanol e Hexano). Foram analisadas 4 amostras, (duas amostras compostas por teias de três machos, e duas amostras compostas por teias de quatro fêmeas), tendo um “par” (macho e fêmea) para cada solvente. Para a extração, as teias foram deixadas por 4 horas em agitador (shaker solab) a 25°C e 180 Rpm, e posteriormente colocadas em centrífuga por 30 min a 4000 Rpm. O sobrenadante foi então analisado em GC-MS. A metodologia de injeção foi adaptada de Esteves (2017).

O gás utilizado como carreador foi o Hélio, em fluxo constante de 2,0 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna variou de 90°C a 280°C, com temperatura inicial de 90°C por 5 minutos, aumentando gradativamente a uma inclinação de 4°C por minuto até 240°C. Após esse período, a temperatura aumentou a uma inclinação de 1°C/min até alcançar 280°C, sendo mantida por 2 minutos. O atraso de solvente foi de 5 minutos e o tempo de equilíbrio de 3 minutos. A porta de injeção foi mantida aquecida a 270°C e 1 µl da amostra foi injetada no modo *splitless*. A coluna usada foi a RTX-5MS (5% diphenyl 95% dimethyl polysiloxane).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises em MEV, os palpos de indivíduos adultos (fixados em álcool 70%) foram removidos por meio de dissecação, e passaram por um processo de limpeza em aparelho de ultrassom. Em seguida, o material foi desidratado em série alcoólica de concentração crescente, passando pelo processo de secagem em ponto crítico. Em seguida, foram fixados em *stubs* com fita dupla face de cobre, e posteriormente metalizados com ouro. As preparações e análise do material foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Rio Claro, em microscópio modelo HITACHI TM3000.

Resultados

Indivíduos coletados em Ituiutaba mostraram-se consideravelmente menores que aqueles encontrados em Pirenópolis, apresentando cerca de metade do tamanho destes, mesmo no estágio adulto (figs. 18-21). Durante a primeira coleta em Pirenópolis, em três ocasiões foram encontrados machos juntamente com as fêmeas, na mesma teia. Os machos virgens, coletados em Pirenópolis em 14 de julho de 2018, começaram a maturar sexualmente a partir do dia 31 de agosto até o dia 19 de outubro de 2018 (tabela 1), vivendo em laboratório em média 133 dias após a última muda ($n = 47$). Ainda não foi possível estabelecer a média de vida das fêmeas depois da maturação uma vez que, até o momento, a grande maioria encontra-se viva em laboratório.

Os testes de teia demonstraram que os machos demoram, em média, 173,7 segundos ou 2:53 minutos para realizar movimentos típicos de corte (*body vibration* ou *papal drumming*) quando inseridos diretamente sobre a teia das fêmeas (tempo de latência), na presença das fêmeas (Desvio padrão de 146 segundos ou 2:26 minutos). Pelo cálculo de mediana, demoram 120 segundos ou 2:00 minutos. Em 56% dos testes (gráfico 1), os movimentos de corte se iniciam até 120 segundos depois da inserção dos machos na teia ($n = 74$ testes). Já os testes sem a presença da fêmea demonstraram que os machos demoram, em média, 128,2 segundos ou 2:08 minutos para realizar os movimentos de corte quando inseridos diretamente sobre a teia das fêmeas (Desvio padrão de 104 segundos ou 1:43 minutos). Pelo cálculo de mediana, demoram 90 segundos ou 1:30 minutos. Em 68% dos testes (gráfico 2), os movimentos de corte se iniciam até 120 segundos depois da inserção dos machos na teia ($n = 63$ testes).

Esses valores foram calculados a partir dos testes em que os machos responderam positivamente à teia das fêmeas, assim, não foi feita a média de tempo que os machos demoraram para realizar outros comportamentos (casos em que os machos não responderam positivamente à teia das fêmeas). Um mesmo indivíduo pode ter sido testado mais de uma vez, uma vez que os testes de teia foram realizados no início de quase todos experimentos, com os mesmos indivíduos.

No entanto, é interessante ressaltar que os machos não reagem a todas as teias em que são depositados. Na maior parte dos testes, foi necessário testar os machos com mais de uma fêmea para que estes indivíduos respondessem positivamente à alguma teia. Também houve casos em que determinada fêmea não era atrativa para um determinado macho, mas se testada com um segundo indivíduo, este por sua vez respondia positivamente. Em outras ocasiões, mais de um macho reagia positivamente à teia de uma mesma fêmea, de forma seguida.

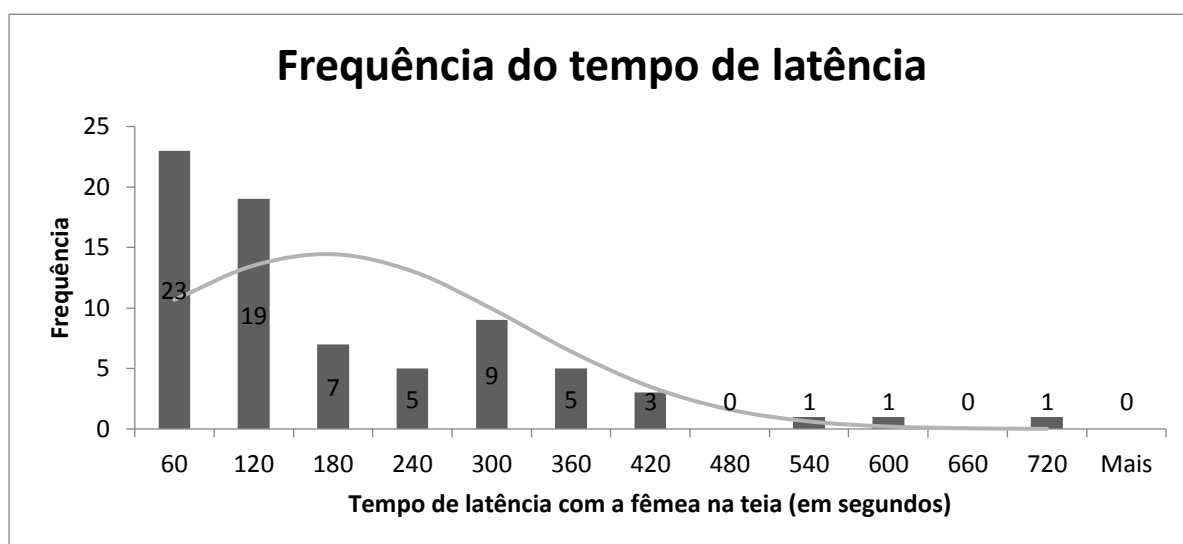


Gráfico 1. Frequência do tempo de latência nos experimentos de teste de teia, com a presença da fêmea na teia.

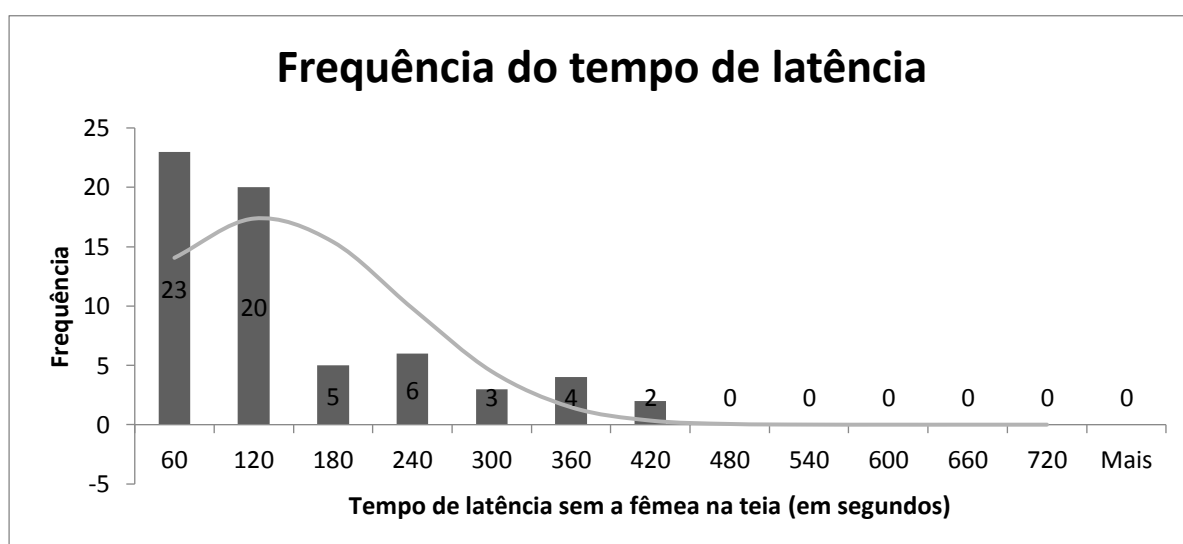


Gráfico 2. Frequência do tempo de latência nos experimentos de teste de teia, sem a presença da fêmea na teia.

Já os testes em arena demonstram que os machos demoram, em média, 6 minutos ($n = 7$ testes) para começar a se mover depois de inseridos na arena. Pelo cálculo da mediana, demoram 3:15 minutos. Dos 7 testes realizados, apenas 4 machos encontram as fêmeas inseridas na arena por meio de fios de teia próximos à passagem dos machos, enquanto os demais machos não conseguiram encontrar as fêmeas (tabela 2).

Em nenhum dos 25 testes realizados no experimento de extração de feromônios houve resposta positiva dos machos aos extratos de teia (tabela 3). Os machos, ao andarem pela placa de Petri e entrarem em contato com o local onde o extrato de teia foi disposto, não apresentaram

nenhum comportamento típico de corte. Os únicos comportamentos verificados durante a observação foram: colocar teia no substrato, ou manter-se imóvel “encolhido” na borda da placa.

Com relação aos testes preliminares de olfatômetro, durante o primeiro dia de experimento na ESALQ, com indivíduos em sua maioria adultos (tabela 4, gráfico 3), e fluxo de ar em 2,0 L/m, dos 12 testes realizados, apenas um macho apresentou resposta positiva ao experimento (ou seja, fez uma escolha entre um dos lados). No entanto, a escolha foi feita para o lado onde se encontrava o tratamento controle (pote vazio), enquanto os demais machos permaneceram parados durante todo o experimento ($n = 5$) ou colocaram teia na base do equipamento ($n = 6$). Já no segundo dia, dentre as 15 tentativas, 3 machos apresentaram resposta positiva ao experimento; no entanto, apenas um destes escolheu o lado onde se encontrava a fêmea e sua teia, enquanto os outros 2 indivíduos escolheram o lado onde se encontrava o tratamento controle (pote vazio). Nos demais testes, os machos permaneceram parados durante todo o experimento ($n = 8$) ou colocaram teia na base do equipamento ($n = 4$).

Por outro lado, durante o último teste preliminar (realizado na UNESP), dentre os 12 testes realizados, 6 machos apresentaram resposta positiva ao experimento, porém apenas metade destes fez a escolha para o lado onde estava localizada a fêmea; os demais escolheram o lado onde estava disposto o tratamento controle (pote vazio). Nos demais testes, um macho permaneceu parado durante todo o experimento, e outro macho foi até o lado controle, voltou e entrou no lado em que se encontrava a fêmea, depois voltou para a base do equipamento, tentando entrar no conector de ar. Os demais colocaram teia na base do equipamento ($n = 4$). Em um panorama geral, dos 39 testes preliminares, apenas em 10 testes os machos mostraram-se responsivos ao experimento (gráfico 3), sendo que desse número, apenas 4 escolheram o lado onde se encontrava o tratamento com a fêmea e sua teia (40%).

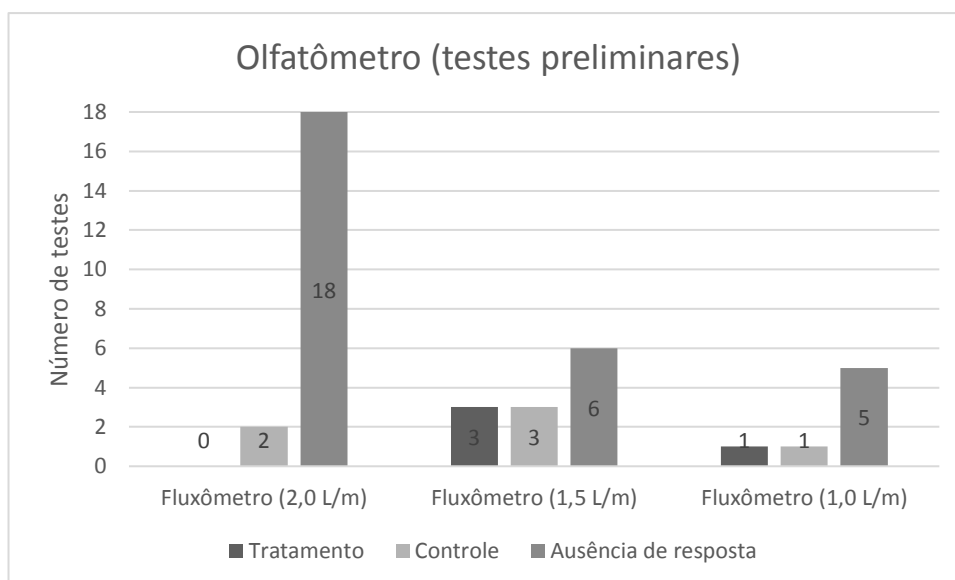


Gráfico 3. Resultados dos experimentos preliminares com olfatômetro representando a resposta (escolha) dos machos não virgens aos testes realizados com fluxo de ar proveniente do uso de fluxômetro a 2,0, 1,5 e 1,0 L/m. Tratamento = escolha dos machos pelo lado onde se encontrava o pote de tratamento (fêmea + teia). Controle = escolha dos machos pelo lado onde se encontrava o pote controle (vazio). Ausência de resposta = macho não realizou nenhuma escolha, permanecendo imóvel, ou realizando comportamentos alternativos (colocar teia no equipamento ou voltar para a base do conector)

No que se refere aos experimentos posteriores com o Olfatômetro realizados na UNESP com indivíduos virgens (tabela 5; gráfico 4), durante os quatro dias de testes realizados com o fluxo de ar proveniente de bombas de aquário, não houve nenhuma resposta positiva em relação ao experimento; o único comportamento observado foi o de colocar teia na base do equipamento ($n = 14$), ou então os indivíduos não se moveram durante todo o experimento ($n = 11$). Já os experimentos realizados na UNESP com a bomba de ar e fluxômetro mostraram que dos 34 testes, 3 machos responderam positivamente ao experimento, sendo que um deles escolheu o lado onde estava localizado o tratamento controle (pote vazio), enquanto os outros 2 escolheram o lado onde se encontrava a fêmea e sua teia. Nos demais testes, os machos permaneceram parados durante todo o experimento ($n = 16$), colocaram teia na base do equipamento ($n = 11$), ou tentaram voltar para a entrada do conector onde foram inseridos ($n = 3$); comportamentos categorizados como “ausência de resposta”.

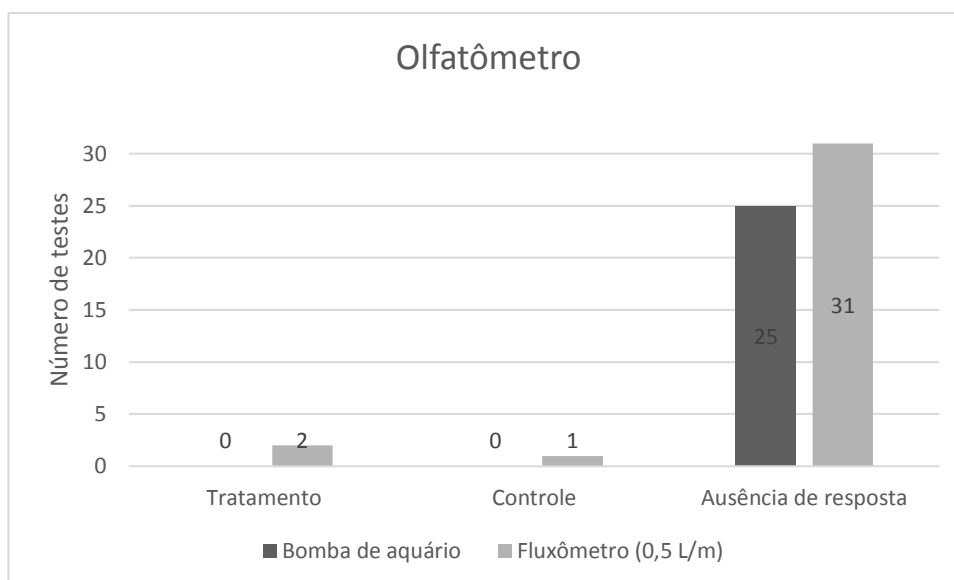


Gráfico 4. Resultados dos experimentos com olfatômetro representando a resposta (escolha) dos machos virgens aos testes realizados com fluxo de ar proveniente de bombas de aquário, ou por meio do uso de fluxômetro a 0,5 L/m. Tratamento = escolha dos machos pelo lado onde se encontrava o pote de tratamento (fêmea + teia). Controle = escolha dos machos pelo lado onde se encontrava o pote controle (vazio). Ausência de resposta = macho não realizou nenhuma escolha, permanecendo imóvel, ou realizando comportamentos alternativos (colocar teia no equipamento ou voltar para a base do conector)

Com relação ao último bioensaio, referente à função da pseudoescópula no reconhecimento co-específico, podemos observar que a remoção das cerdas (gráfico 5) só impediu o reconhecimento da teia das fêmeas pelos machos em 25% dos testes ($n = 4$). Com relação aos tratamentos de obstrução (gráfico 6), o uso do DMSO impediu o reconhecimento em 50% dos testes ($n = 4$), enquanto o uso da vaselina impediu o reconhecimento dos machos em 75% dos testes ($n = 12$), sendo que apenas 3 em um total de 12 machos apresentou movimentos típicos de corte e cópula quando entraram em contato com a teia das fêmeas.

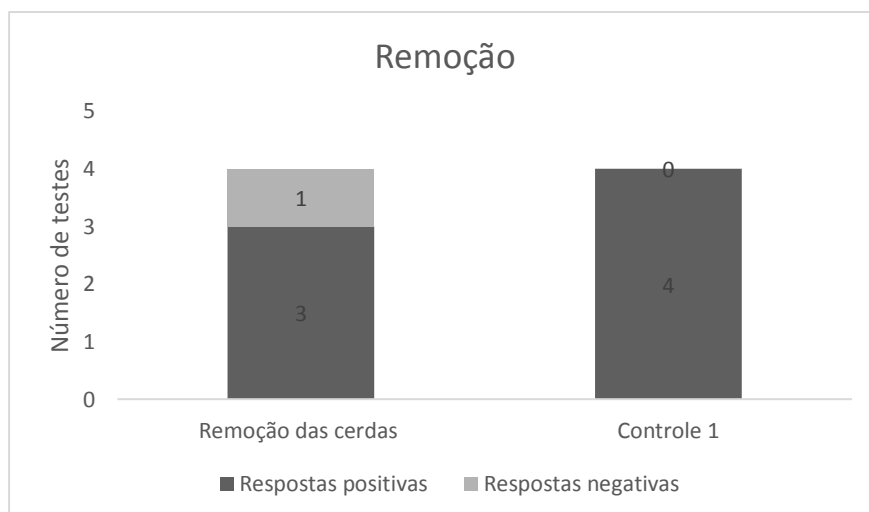


Gráfico 5. Resultados dos experimentos de remoção da pseudoescópula. Remoção das cerdas = remoção das cerdas da pseudoescópula. Controle 1 = remoção das cerdas ventrais do metatarso.

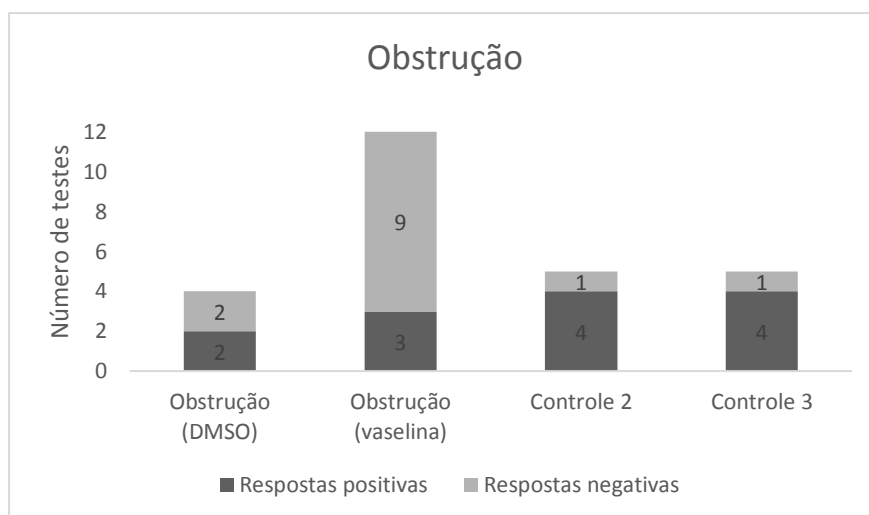


Gráfico 6. Resultados dos experimentos de obstrução da pseudoescópula. Respostas positivas = número de vezes em que os machos realizaram comportamento de corte. Respostas negativas = número de vezes em que os machos realizaram comportamentos alternativos. Obstrução (DMSO) = obstrução das cerdas da pseudoescópula com DMSO. Obstrução (Vaselina) = obstrução das cerdas da pseudoescópula com vaselina. Controle 2 = obstrução das cerdas dorsais do tarso com vaselina. Controle 3 = obstrução das cerdas ventrais do metatarso com vaselina.

A análise química dos extratos de teia realizada por cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massa (CG-MS) não detectou nenhuma substância nas teias de machos ou fêmeas que não fosse proveniente do próprio solvente utilizado na extração, ou que tivesse alto nível de compatibilidade (>90%) quando comparado à biblioteca de massas moleculares.

Quanto à análise dos palpos por microscopia eletrônica de varredura, foi observada a presença de cerdas da pseudoescópula também no dorso dos palpos de machos adultos (maduros sexualmente), em pouquíssimas quantidades (3 cerdas), próximas à região apical do palpo (figs. 22 e 23), mas nenhuma cerda na região ventral do palpo (figs. 24 e 25).



Figura 18-21. Exemplos adultos de *Ischnothele annulata*. 18,20. macho e fêmea coletados em Ituiutaba (MG). 19,21. macho e fêmea coletados em Pirenópolis (GO). Escala: 8mm.

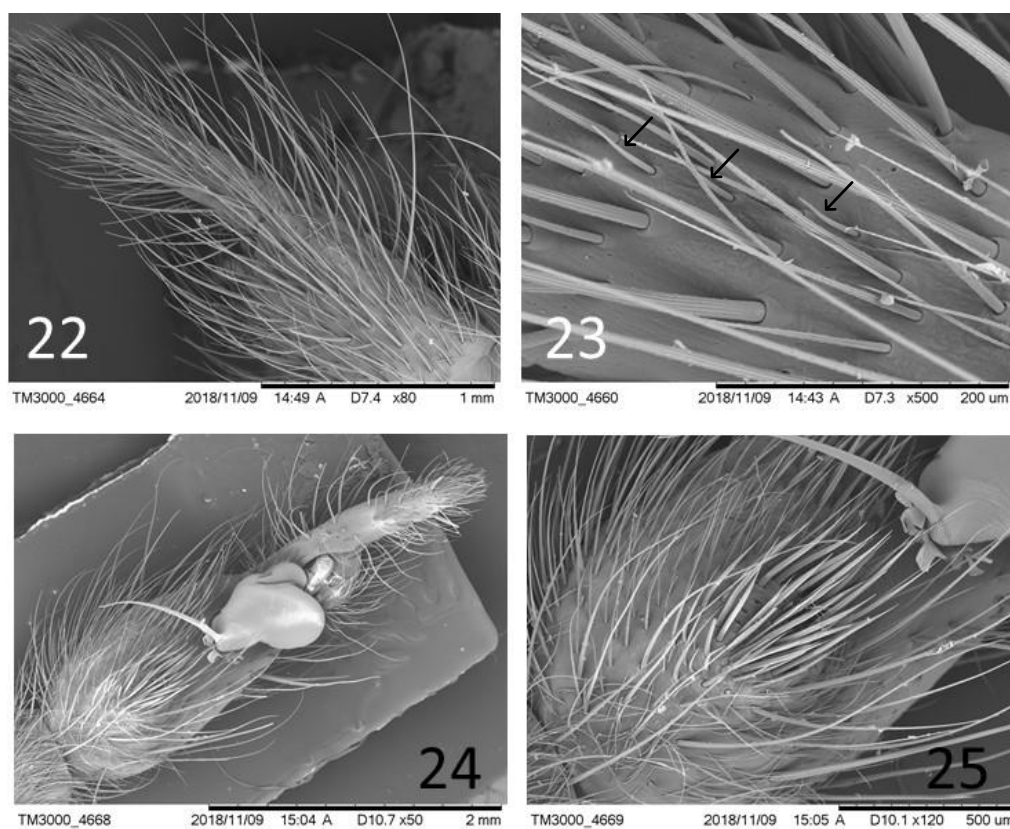


Figura 22-25. Micrografias dos palpos de *Ischnothele annulata* (Microscopia Eletrônica de Varredura). 22,23. Vista dorsal. 24,25. Vista ventral. Setas indicam posição das cerdas da pseudoscápula.

Tabela 1. Tempo de vida (em dias) desde a maturação em laboratório até a morte dos indivíduos machos coletados jovens em julho de 2018 (Pirenópolis). Dados faltantes estão sinalizados com o símbolo “-”.

♂	Data da última muda	Data da Morte	Tempo de vida
Piri 202	04/10/2018	18/03/2019	165
Piri 206	-	-	-
Piri 209	19/09/2018	01/03/2019	163
Piri 211	19/09/2018	08/02/2019	142
Piri 212	03/10/2018	19/02/2019	139
Piri 214	-	18/02/2019	-
Piri 215	12/09/2018	-	-
Piri 221	27/09/2018	07/02/2019	133
Piri 222	17/09/2018	30/11/2018	74
Piri 224	31/08/2018	-	-
Piri 225	26/09/2018	12/02/2019	139
Piri 226	24/09/2018	01/02/2019	130
Piri 228	24/09/2018	07/02/2019	136
Piri 229	19/09/2018	21/02/2019	155
Piri 231	12/09/2018	18/02/2019	159
Piri 232	12/09/2018	-	-
Piri 233	26/09/2018	12/03/2019	167
Piri 235	-	04/10/2018	-
Piri 238	03/10/2018	-	-
Piri 239	17/09/2018	10/01/2019	115
Piri 240	11/10/2018	07/03/2019	147
Piri 241	06/09/2018	29/12/2018	114
Piri 242	06/09/2018	-	-
Piri 243	19/09/2018	18/03/2019	180
Piri 244	19/09/2018	-	-
Piri 245	12/09/2019	-	-
Piri 247	03/10/2018	11/03/2019	159
Piri 249	12/09/2018	15/01/2019	125
Piri 252	20/09/2018	07/03/2019	168
Piri 254	19/09/2018	-	-
Piri 255	20/09/2018	04/10/2018	14
Piri 256	12/09/2018	29/12/2018	108
Piri 258	28/09/2018	30/11/2018	63
Piri 259	19/10/2018	05/04/2019	168
Piri 261	19/09/2018	18/02/2019	152
Piri 262	19/09/2018	23/01/2019	126
Piri 263	19/09/2018	28/01/2019	131
Piri 269	19/09/2018	07/03/2019	169
Piri 270	19/09/2018	30/11/2018	72
Piri 273	12/09/2018	26/12/2018	105
Piri 277	12/09/2018	-	-
Piri 280	26/09/2018	14/01/2019	110
Piri 281	12/09/2018	30/11/2018	79
Piri 288	12/09/2018	11/03/2019	180
Piri 293	-	-	-
Piri 295	28/09/2018	-	-
Piri 298	26/09/2018	07/03/2019	162
Piri 300	19/09/2018	07/03/2019	169
Piri 301	03/10/2018	01/02/2019	121
Piri 303	26/09/2018	07/01/2019	103
Piri 304	18/07/2018	11/02/2019	208
Piri 306	19/09/2018	26/12/2018	98
Piri 307	19/09/2018	12/03/2019	174
Piri 308	06/09/2018	05/01/2019	121
Piri 309	19/09/2018	05/01/2019	108
Piri 310	17/09/2018	12/02/2019	148
Piri 311	19/09/2018	18/03/2019	180
Piri 314	19/09/2018	15/01/2019	118
Piri 321	31/08/2018	26/12/2018	117
Piri 323	28/09/2018	25/01/2019	119
Piri 326	03/10/2018	18/01/2019	107
Média:			133

Tabela 2. Resultados do experimento em arena. ♂ = indivíduo macho utilizado no experimento. Tempo = tempo em minutos desde a colocação do macho na arena, até o início de seus movimentos. Posição inicial = posição do macho quando colocado na arena. Descrição do comportamento = todos movimentos do macho durante todo o experimento. BV= body vibration.

♂	Tempo (min.)	Posição inicial	Descrição do comportamento
300	15:00	Voltado para a frente da arena	Vira em direção ao fundo da arena, anda em diagonal até chegar na borda, seguindo-a até encontrar fios de teia na terra. Automaticamente muda de direção, indo direto para o pote da fêmea, fazendo BV enquanto entra na teia.
293	21:00	Voltado para o lado esquerdo (fundo, em diagonal) da arena	Vira de costas para a fêmea, encosta na parte da frente da arena, vira novamente, andando no sentido do lado esquerdo (fundo) da arena, seguindo pela borda até os fundos da arena; passa atrás do pote da fêmea, continua seguindo pela borda até o lado direito, dando toda volta até chegar onde começou. Não se move mais até o final do experimento.
240	00:40	Voltado para o lado direito (fundo, em diagonal) da arena	Aos 50 segundos, anda para o lado direito, encosta na lateral da arena, volta margeando a borda da frente, seguindo para o lado esquerdo, passando pela lateral esquerda, na altura do pote da fêmea, ele muda bruscamente a direção até chegar ao pote da fêmea, e entra na teia fazendo BV.
269	03:15	Voltado para o lado direito (lateral) da arena	Corre diretamente até a lateral direita, volta pela borda, e sai da arena. Colocado de volta na arena, fica parado por muitos minutos, depois corre para esquerda, volta para direita, e sai novamente da arena. Colocado novamente, segue a borda direita, corre atrás do pote da fêmea, encontra fios de teia, e entra no pote da fêmea, sem fazer BV.
238	01:00	Voltado para o lado esquerdo (fundo, em diagonal) da arena	Corre para o lado esquerdo (fundo) da arena, passando ao lado do pote da fêmea. Ao chegar no fundo, sai da arena. Colocado novamente, anda até a borda direita, e volta para frente da arena, fica na borda ao tentar sair. Colocado novamente, fica parado por 10 minutos, depois anda para a lateral esquerda da arena, seguindo a borda até a frente da arena e sai novamente.
206	00:31	Voltado diretamente para o pote da fêmea	Anda para o lado direito da arena até chegar na borda, por onde vai seguindo até passar pela parte de trás do pote da fêmea, passar para o lado esquerdo da arena (tentando sair da arena). Depois, pelo mesmo caminho de ida, ele segue a borda de volta para o lado direito, e segue em diagonal até o ponto em que foi inserido na arena, mas continua caminhando até chegar no lado esquerdo da frente da arena, onde contorna a borda até o lado direito (frente) e sai da arena. Colocado na arena novamente, anda para o lado direito em direção à borda e começa a colocar teia.
243	05:00	Voltado para o lado direito (lateral) da arena	Faz a volta e anda para o lado esquerdo da arena, segue pela borda, e ao encostar na arena, vai para o lado direito, contorna o pote da fêmea, e encontra fios de teia atrás do pote. Segue os fios e entra no pote da fêmea, com movimentos de BV.
Média:		06:38	
Mediana:		03:15	

Tabela 3. Resultados dos experimentos de extração de feromônios. ♂ = macho utilizado no experimento. ♀ = fêmea utilizada no experimento. Solvente = tipo de solvente utilizado na extração, µl = volume de solvente utilizado na extração. Metodologia de extração = forma como a teia foi inserida no solvente para a extração. Data = quando a extração foi realizada. Substrato = meio inerte utilizado para a disposição do extrato de teia. Resposta do macho = se o macho realizou ou não comportamentos típicos de corte após entrar em contato com o substrato com extrato de teia. Teste de teia posterior = se o macho realizou ou não comportamentos típicos de corte ao ser submetido à teste de teia após o experimento de extração.

♂	♀	Solvente	µl	Tempo (hrs)	Metodologia de extração	Data	Substrato	Resposta macho	Teste teia posterior
321	260	água destilada	100	3 a 4	diretamente no solvente	24/set	papel filtro	negativo	Ø
304	294							negativo	positivo
241	268							negativo	negativo
281	279							negativo	positivo
310	302	methanol	100	3	capilar de vidro	27/set		negativo	positivo
215	234			4				negativo	Ø
273	279			4 a 5				negativo	Ø
277	212			5				negativo	Ø
321	260		200	Ø	macerado por 5 min + concentrador amostra	02/out		negativo	positivo
304	319					negativo		negativo	
310	318		200	1	macerado por 3 min	08/out		negativo	positivo
232	271				diretamente no solvente			negativo	Ø
309	320				capilar de vidro			negativo	Ø
241	286		300	3	capilar de vidro	01/out		negativo	negativo
273	227				macerado por 3 min			negativo	negativo
277	268				macerado por 3 min			negativo	positivo
321	213		800	24	diretamente no solvente	22/nov	gaze	negativo	positivo
241	223							negativo	negativo
310	207	hexano	200	3	diretamente no solvente	08/out	papel filtro	negativo	positivo
273	279							negativo	negativo
256	299			negativo	Ø				
273	248	ethanol	200	6	macerado por 3 min	02/out		negativo	negativo
277	278							negativo	positivo
3	*	acetonitrila	100	1	diretamente no solvente	29/jan		negativo	Ø
3	*			2		30/jan		negativo	Ø

Tabela 4. Resultados dos testes preliminares com olfatômetro realizados em 2017. Data = quando o experimento foi realizado. Local = lugar onde o experimento foi realizado. ♂ = macho utilizado no experimento. ♀ = fêmea utilizada no experimento. Escolha = escolha que o macho realizou, podendo ser o pote do tratamento (vazio), ou o pote experimental (com a fêmea juntamente com sua teia). Lado = de que lado o pote em questão estava posicionado em relação à sala onde estava ocorrendo o experimento, podendo estar localizado próximo à porta, ou à janela. Fluxo = fluxo de ar utilizado no experimento, em Litros por metro. Status rep. = status reprodutivo do indivíduo na data do experimento.

Data	Local	♂	♀	Escolha	Lado	Fluxo (L/m)	Status rep.
22/jan	ESALQ	53	4	vazio	porta	2,0	Não virgem
		10	4	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		10	51	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		55	51	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		13	15	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		V1	15	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		V1	V2	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		VJU1	V2	Ø	Ø	2,0	Virgem
		VJU1	15	Ø	Ø	2,0	Virgem
		VJU2	39	Ø	Ø	2,0	Virgem
		VJU2	39	Ø	Ø	2,0	Virgem
		37	36	Ø	Ø	2,0	Não virgem
23/jan	ESALQ	29	17	vazio	janela	1,0	Não virgem
		35	17	Ø	Ø	1,0	Não virgem
		28	17	Ø	Ø	1,0	Não virgem
		53	36	fêmea	janela	1,0	Não virgem
		10	36	Ø	Ø	1,0	Não virgem
		55	39	Ø	Ø	1,0	Não virgem
		55	36	Ø	Ø	1,0	Não virgem
		12	3	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		12	17	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		22	17	vazio	janela	2,0	Não virgem
		VJU5	V1	Ø	Ø	2,0	Virgem
		13	39	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		37	3	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		V1	V1	Ø	Ø	2,0	Não virgem
		VJU2	V2	Ø	Ø	2,0	Virgem
06/fev	UNESP	12	15	fêmea	porta	1,5	Não virgem
		10	15	Ø	Ø	1,5	Não virgem
		35	15	Ø	Ø	1,5	Não virgem
		22	4	vazio	porta	1,5	Não virgem
		37	4	vazio	porta	1,5	Não virgem
		28	51	Ø	Ø	1,5	Não virgem
		55	51	fêmea	porta	1,5	Não virgem
		VJU1	17	Ø	Ø	1,5	Virgem
		V1	17	fêmea	parede	1,5	Não virgem
		VJU2	V2	Ø	Ø	1,5	Virgem
		VJU5	V2	Ø	Ø	1,5	Virgem
		VJU	39	vazio	parede	1,5	Virgem

Tabela 5. Resultados dos testes com olfatômetro. Data = quando o experimento foi realizado. Local = lugar onde o experimento foi realizado. ♂ = macho utilizado no experimento. ♀ = fêmea utilizada no experimento. Escolha = escolha que o macho realizou, podendo ser o pote do controle (vazio), ou o pote experimental (com a fêmea juntamente com sua teia). Lado = de que lado o pote em questão estava posicionado em relação à sala onde estava ocorrendo o experimento, podendo estar localizado próximo à porta, ou à janela. Fluxo = fluxo de ar utilizado no experimento, em litros por minuto. Habituação = tempo que o macho foi deixado dentro do olfatômetro antes de ligar o fluxo de ar. Teste de teia anterior = resposta do macho aos experimentos de teste de teia antes da realização do experimento com olfatômetro. Teste de teia posterior = resposta do macho aos experimentos de teste de teia após a realização do experimento com olfatômetro. Data = data do teste de teia posterior. Status rep. = status reprodutivo do indivíduo na data do experimento.

Data	Local	♂	♀	Escolha	Lado	Fluxo (L/m)	Habituação	Teste teia anterior	Teste teia posterior	Data	Status rep.
16/out	UNESP	225	260	Ø	Ø	Aquário	3 min	Ø	negativo	17/out	Virgem
		273	260	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		232	278	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		321	284	Ø	Ø	Aquário	9 min		negativo		
		256	278	Ø	Ø	Aquário	3 min		Ø		
19/out	UNESP	281	279	Ø	Ø	Aquário	0 min	Ø	negativo	22/out	Virgem
		231	279	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		309	268	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		239	294	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		262	218	Ø	Ø	Aquário	3 min		positivo		
		254	268	Ø	Ø	Aquário	4 min		Ø		
		304	294	Ø	Ø	Aquário	3 min		Ø		
23/out	UNESP	311	234	Ø	Ø	Aquário	3 min	Ø	negativo	24/out	Virgem
		270	234	Ø	Ø	Aquário	3 min		positivo		
		229	302	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		306	302	Ø	Ø	Aquário	3 min		positivo		
		269	248	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		314	248	Ø	Ø	Aquário	3 min		Ø		
26/out	UNESP	307	282	Ø	Ø	Aquário	3 min	Ø	positivo	30/out	Virgem
		221	282	Ø	Ø	Aquário	Ø		positivo		
		300	286	Ø	Ø	Aquário	3 min		positivo		
		270	213	Ø	Ø	Aquário	2 min		positivo		
		314	216	Ø	Ø	Aquário	3 min		positivo		
		269	223	Ø	Ø	Aquário	3 min		negativo		
		252	286	Ø	Ø	Aquário	3 min		Ø		
27/nov	UNESP	288	292	Ø	Ø	2,0	2 min	positivo	Ø	Ø	Virgem
		221	292	Ø	Ø	1,0	2 min	positivo			
		321	320	Ø	Ø	1,0	2 min	positivo			
		273	320	Ø	Ø	0,5	5 min	positivo			
		323	213	Ø	Ø	0,5	5 min	positivo			
		295	213	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		226	268	Ø	Ø	0,5	6 min	positivo			
		241	268	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		210	227	fêmea	porta	0,5	3 min	positivo			
		202	227	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		231	242	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		298	242	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		301	200	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		258	200	Ø	Ø	0,5	Ø	positivo			
		204	275	Ø	Ø	0,5	3 min	positivo			
		228	275	Ø	Ø	0,5	5 min	positivo			
28/nov	UNESP	233	223	Ø	Ø	1,5	3 min	Ø	negativo	29/nov	Ø
		280	223	Ø	Ø	1,0	3 min	Ø	positivo		
		300	278	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	positivo		
		311	278	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		307	322	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		256	322	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	positivo		
		306	218	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	positivo		
		229	218	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	Ø		
		249	294	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	positivo		
		239	294	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	Ø		
		262	207	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		269	207	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		310	230	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		309	230	fêmea	janela	0,5	3 min	Ø	negativo		
		232	299	vazio	janela	0,5	3 min	Ø	negativo		
		281	299	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	Ø		
		225	112	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		
		252	112	Ø	Ø	0,5	3 min	Ø	negativo		

Tabela 6. Resultados dos testes de remoção / obstrução das cerdas da pseudoescópula. ♂ = macho utilizado no experimento. ♀ = fêmea utilizada no experimento. N° casal = número dado a cada casal de macho e fêmea utilizados no experimento. Grupo = qual grupo, entre experimental ou controle aquele casal pertence. Procedimento = tipo de tratamento utilizado, podendo ser remoção ou obstrução das cerdas. Estrutura = especificação da estrutura que passou pelo procedimento. Material = material utilizado no procedimento. Cortejo após procedimento = resposta do macho à teia da fêmea, após a realização do procedimento. Data = quando o experimento foi realizado.

♂	♀	N° casal	Grupo	Procedimento	Estrutura	Material	Cortejo após procedimento	Data
306	200	1	exp.	REMOÇÃO	pseudoescópula	agulha	SIM	06/dez
323	275	2					SIM	06/dez
225	112	3					SIM	06/dez
310	320	4					NÃO	06/dez
229	324	5	controle	REMOÇÃO	cerdas metatarso	agulha	SIM	19/dez
252	305	6					SIM	21/dez
240	213	7					SIM	12/fev
4	14	8					SIM	11/fev
226	223	9	exp.	OBSTRUÇÃO	pseudoescópula	parafina	SIM	10/dez
303	292	10	exp.	OBSTRUÇÃO	pseudoescópula	DMSO	NÃO	19/dez
295	248	11					SIM	19/dez
233	282	12					SIM	20/dez
209	264	13					NÃO	20/dez
241	278	14	exp.	OBSTRUÇÃO	pseudoescópula	vaselina	NÃO	10/dez
247	207	15					NÃO	11/dez
202	268	16					SIM	11/dez
210	216	17					NÃO	13/dez
VJU9	220	18					NÃO	13/dez
256	284	19					NÃO	28/dez
263	299	20					NÃO	28/dez
228	283	21					SIM	29/dez
311	257	22					NÃO	29/dez
ittb 103	227	23					NÃO	29/dez
300	315	24					NÃO	12/fev
261	217	25					SIM	12/fev
232	212	26	controle	OBSTRUÇÃO	cerdas metatarso	vaselina	NÃO	13/dez
262	290	27					SIM	18/dez
314	230	28					SIM	18/dez
iiitb 95	279	29					SIM	19/dez
204	285	30					SIM	19/dez
309	318	31	controle	OBSTRUÇÃO	cerdas dorsais tarso	vaselina	SIM	22/dez
298	246	32					NÃO	22/dez
301	302	33					SIM	22/dez
6	18	34					SIM	11/fev
3	11	35					SIM	11/fev

Discussão

Os testes de teia e de arena demonstram que os machos exibem comportamentos de corte ao entrar em contato com a teia das fêmeas co-específicas, e que esse reconhecimento acontece rapidamente. O tempo de reação dos machos parece ser instantâneo, uma vez que foi observado, durante os testes de arena, que eles mudam a direção de caminhada instantaneamente, seguindo os fios de teia uma vez que entrem em contato com eles. O tempo maior de reação durante os testes de teia poderia ser explicado pela manipulação dos indivíduos, uma vez que eram retirados de seus refúgios e colocados artificialmente e diretamente sobre a teia das fêmeas. Com relação ao direcionamento dos machos, os testes de arena parecem indicar que os machos não se utilizam de sinais químicos de origem volátil, uma vez que três indivíduos tentam sair da arena insistentemente ao invés de caminhar para o local onde estavam dispostas as fêmeas, e os demais parecem andar aleatoriamente na arena até encontrarem aparentemente por acaso fios de teia próximos ao refúgio.

A variabilidade de atratividade das teias das fêmeas parece indicar que o reconhecimento das teias é mediado por substâncias químicas, em detrimento de apenas pistas mecânicas. Em espécies onde o reconhecimento da teia é mecânico, como por exemplo em *Misumena vatia* (Clerck, 1757) (Thomisidae), machos adultos apresentam o comportamento de seguir a teia das fêmeas em 67% das vezes ($n = 15$) em que são apresentados à estas teias (ANDERSON, MORSE, 2001) além de também poderem seguir a teia de outros machos, com menor frequência (LEONARD, MORSE, 2006). Durante os testes de teia, houve a necessidade de utilizar várias fêmeas para obter uma resposta positiva de um macho, e algumas delas se mostravam atrativas a um determinado macho, e não a outro, em um teste consecutivo. Em aranhas, já foi reportado que por meio de feromônios de contato, os machos podem acessar detalhes do indivíduo que permitem acessar a “qualidade” de um provável parceiro sexual, como por exemplo o estado de alimentação das fêmeas (BARUFFALDI, ANDRADE, 2015), o que explicaria a preferência de alguns indivíduos e rejeição de outros a uma mesma fêmea, que não deveria ocorrer se o reconhecimento ocorresse exclusivamente de forma mecânica.

Outro fator que explicaria a falta de atratividade das teias em determinados dias, seria a possível curta persistência das pistas químicas na teia, aspecto não estudado neste trabalho. Teias de uma *Schizocosa malitiosa* (Lycosidae) continuam atrativas apenas por até uma semana (BARUFFALDI, 2010), enquanto que as teias de uma *Eupalaestrus weijenberghi* (Theraphosidae) podem permanecer atrativas por até 46 dias (COSTA, CURBELO, PERÉZ-MILES, 2015). Essa diferença de tempo poderia refletir as características dessas espécies, uma

vez que os machos *E. weijenberghi* vivem em pradarias e tem um período sexual restrito, de apenas 2 meses. Uma curta persistência das pistas poderia fazer com que machos perdessem oportunidades de acasalamento devido à uma teia não atrativa, e dificultar o encontro de parceiros. Já no caso das *Ischnothele annulata*, por possuírem populações agregadas (NARDI, 2016), e alta capacidade de produção de teia, mesmo que um macho perdesse a oportunidade de acasalamento com uma fêmea por uma teia não atrativa, ele não precisaria percorrer longas distâncias para encontrar outra parceira. Inclusive, estudos filogeográficos recentes com esta espécie mostram a existência de 7 halótipos em 6 populações diferentes, demonstrando uma alta estruturação da população, um indício de que os indivíduos não percorrem grandes distâncias apesar de serem populações que ocupam quatro estados próximos, e a distribuição geográfica da espécie incluir registros em toda diagonal seca (caatinga, cerrado e chaco) (J. MENDES Jr., com. pess.).

Os resultados dos testes preliminares com o olfatômetro demonstram que os machos mostraram-se mais responsivos ao experimento realizado na UNESP (6 machos responsivos) em comparação com os dois testes anteriores realizados na ESALQ (1 e 3 machos responsivos, no primeiro e segundo dia de teste, respectivamente). A diferença no número de indivíduos responsivos entre as duas localidades, e entre os dois dias de teste na ESALQ pode ter ocorrido devido ao stress causado pela viagem de Rio Claro até Piracicaba, que aconteceu na manhã do dia 22 de Janeiro, data do primeiro teste preliminar. No entanto, também devemos considerar o fluxo de ar utilizado nas diferentes ocasiões uma vez que no primeiro dia de teste o fluxo encontrava-se a 2,0 L/m e não obtivemos nenhuma resposta; no segundo dia, em fluxo 2,0 L/m obtivemos a resposta de um macho apenas, e mais duas respostas em um fluxo de 1,0 L/m; no terceiro dia de teste, com fluxo 1,5 L/m obtivemos 6 machos responsivos. Assim, poderíamos hipotetizar que o fluxo de ar em 2,0 L/m nos primeiros testes preliminares poderia ser um fator estressante para os indivíduos, mantendo-os na base do equipamento, sem “explorar” o equipamento. A ausência de qualquer resposta dos machos (virgens) durante os experimentos posteriores com o fluxo proveniente da bomba de aquário também parece indicar que um alto fluxo de ar diminui a resposta dos machos ao experimento. Uma possível explicação para este stress poderia estar relacionada com a perda de água evaporativa decorrente do alto fluxo de ar. Um estudo recente realizado com aranhas migalomorfas de alçapão parece indicar que este grupo prefere locais com umidade mais elevada, sendo esta uma das características chave na seleção de hábitat, e na sobrevivência da espécie (TROVA, 2019). No entanto, mesmo quando realizados testes posteriores com indivíduos virgens em um menor fluxo de ar (0,5 L/m)

tampouco obtivemos um maior sucesso com a resposta dos machos ao experimento, que responderam positivamente ao experimento em apenas 3 dos 34 testes (9%).

Os testes de teia realizados após o 6º teste com o olfatômetro (dia 27 de Novembro) mostram que grande parte dos machos (67%) quando colocados diretamente em contato com as teias das fêmeas no dia seguinte ao experimento, não apresentaram comportamentos de corte. Essa falta de resposta dos machos poderia indicar que as fêmeas em questão não estariam emitindo feromônios durante o experimento; no entanto, mesmo nos casos onde os machos responderam positivamente aos testes de teia (37%), não houve nenhuma resposta positiva ao experimento do olfatômetro (tabela 5). Esses dados, aliados ao fato de que ao todo (entre experimentos preliminares e testes posteriores), das 12 ocasiões em que os machos efetivamente fizeram uma escolha, em apenas 6 ocasiões (50%) eles escolheram o lado onde se encontrava a fêmea, parecem indicar que essa espécie não apresenta reconhecimento co-específico por meio de sinais químicos de origem volátil. Um estudo recente realizado com outro representante de aranha Mygalomorphae, *Acanthogonatus centralis* (Theraphosidae), parece indicar que esta espécie não se utiliza de sinais químicos de origem volátil na comunicação intrespecífica, a partir de testes com olfatômetro (COPPERI, FERRETTI, PERETTI, 2019).

A falta de resposta dos machos aos extratos de teia demonstra que os testes de extração de feromônio realizados não foram suficientes para estabelecer uma metodologia satisfatória para a obtenção dos componentes químicos que poderiam desencadear os comportamentos típicos de corte dos machos. A metodologia de extração varia para cada espécie, e os solventes que se mostraram mais eficientes para extração de feromônios presentes em teias em trabalhos anteriores, foram água e metanol. Apesar da nossa metodologia ter focado nesses solventes e ter como base o tempo de outros experimentos que tiveram sucesso com a extração, é interessante ressaltar que estes experimentos foram feitos apenas com aranhas araneomorfas, podendo, portanto, haver uma diferença significativa no tempo de extração para espécies de migalomorfas. Assim, no curto período em que os exemplares machos virgens permaneceram adultos e vivos em laboratório, não foi possível obter uma metodologia satisfatória para a extração dessas substâncias. A falta de resultados com a análise de CG-MS também corrobora para um problema na metodologia de extração, uma vez que as substâncias encontradas na análise eram provenientes apenas dos solventes utilizados, ou então de uma contaminação na amostra, o que explica os resultados de substâncias com baixa porcentagem de compatibilidade.

Com relação aos experimentos de obstrução e remoção das cerdas da pseudoescópula, podemos destacar que a manipulação dos indivíduos (anestesia, manejo do animal e tratamento) nos testes controle não afetou a capacidade destes de reconhecer a teia (vazia) das fêmeas uma

vez que 100% (remoção cerdas do metatarso, $n = 4$), ou 80% (obstrução das cerdas do metatarso, $n = 5$; e obstrução das cerdas dorsais do tarso, $n = 5$) dos indivíduos testados negativamente, apresentaram comportamentos de corte ao serem colocados diretamente na teia das fêmeas após o tratamento (gráficos 5 e 6).

A metodologia de obstrução com vaselina, por sua vez, impediu o reconhecimento das teias pelos machos em 9 das 12 vezes (75%). Em duas ocasiões (testes com casal 20 e 24), os machos só fizeram movimentos de corte depois de efetuarem comportamentos de limpeza dos tarsos, e, nesses casos, também foi considerado que houve o impedimento do reconhecimento. Com relação aos três machos que, mesmo com a cerda obstruída, realizaram movimentos de corte, não podemos excluir a possibilidade de que o reconhecimento possa ter sido realizado pelas pouquíssimas cerdas da pseudoescópula encontradas no címbio dos machos, ou até mesmo por outras cerdas sensoriais, do tipo que encontra-se presente tanto em exemplares de fêmeas, quando nos machos, sendo adicionais, para os machos, às cerdas da pseudoescópula. No entanto, em uma destas três ocasiões, após realizar a corte, o macho não realiza a limpeza dos tarsos e permanece imóvel próximo ao substrato durante todo o experimento; quando removido do pote da fêmea após o experimento, e colocado sobre sua própria teia, em seu pote de manutenção, foi possível registrar o comportamento de corte em sua própria teia. Esse foi o único registro de um macho realizando movimentos típicos de corte em uma teia de macho. A partir dessa observação, não podemos descartar a ideia de que, impossibilitado de reconhecer o substrato em que estava disposto, este macho poderia realizar os movimentos de corte como forma de “precaução”, evitando assim uma possível predação, hipótese que também explicaria a resposta positiva dos outros dois machos ao experimento. Em mais de uma ocasião, durante os testes de teia realizados com a presença da fêmea na teia, foram observados machos que não responderam positivamente à teia da fêmea, ou seja, em contato com a teia, realizaram comportamentos alternativos como andar na teia ou autolimpeza; no entanto, uma vez que as fêmeas se moviam, o macho iniciava algum comportamento de corte (body vibration ou papal drumming). Esses registros parecem indicar que os movimentos de corte são utilizados como mecanismo de reconhecimento da espécie, e portanto, um possível mecanismo de defesa contra a predação em situações onde possivelmente outros tipos de reconhecimento (como por exemplo o químico), não surtiram efeito.

Com base nos resultados aqui apresentados, podemos sugerir que a forma principal de reconhecimento entre machos de *Ischnothele annulata* e as fêmeas co-específicas, é por intermédio de suas teias, possivelmente por sinais químicos de curto alcance (contato) inseridos nestas (não caracterizado neste trabalho), utilizando-se primariamente das cerdas da

pseudoescópula para efetuar esse reconhecimento. A utilização de sinais químicos de contato, ao invés da utilização de componentes voláteis pode ser explicada, para esta espécie, pelo fato de que os indivíduos e populações encontram-se naturalmente próximos uns dos outros, não sendo necessária a utilização de componentes de longa distância, como os feromônios voláteis, para que os indivíduos se encontrem na natureza.

Referências

- ANDERSON, J. T.; MORSE, D. H. Pick-up lines: cues used by male crab spiders to find reproductive females. **Behavioral Ecology**, v. 12, n. 3, p. 360-366, 2001.
- BARTH, F. G. Feinstruktur des Spinneninteguments. II. Die raumliche Anordnung der Mikrofasern in der lamellierten Cuticula und ihre Beziehung zur Gestalt der Porenkanäle (Cupiennius salei Keys., adult, hautungsfer, Tarsus). **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, 1970.
- BARTH, F. G. **Sinne und Verhalten**: aus dem Leben einer Spinne. Springer-Verlag, 2013.
- BARUFFALDI, L.; COSTA, F. G., RODRÍGUEZ, A., GONZÁLEZ, A. Chemical communication in *Schizocosa malitiosa*: evidence of a female contact sex pheromone and persistence in the field. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 7, p. 759-767, 2010.
- BARUFFALDI, L; ANDRADE, M. C. B. Contact pheromones mediate male preference in black widow spiders: avoidance of hungry sexual cannibals? **Animal Behaviour**, v. 102, p. 25-32, 2015.
- COSTA, F. G.; CURBELO, B.; PÉREZ-MILES, F. Long-term persistence and water resistance of female sex cues in the tarantula *Eupalaestrus weijenberghi* (Araneae: Theraphosidae). **Arachnology**, v. 16, n. 9, p. 311-313, 2015.
- BATES, H. W. **The naturalist on the river Amazons**, 465 pp., illus. Map. University of California Press, Berkeley. 1962.
- ESTEVES, F. G. **Caracterização proteometabolômica dos componentes da teia da aranha *Nephila clavipes* utilizados na estratégia de captura de presas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2017.
- FERRETTI, N., POMPOZZI, G., COPPERI, S., GONZÁLEZ, A., & PÉREZ-MILES, F. Sexual behaviour of mygalomorph spiders: when simplicity becomes complex; an update of the last 21 years. **Arachnology**, v. 16, n. 3, p. 85-94, 2013.
- FISCHER, A. Chemical communication in spiders—a methodological review. **The Journal of Arachnology**, v. 47, n. 1, p. 1-27, 2019.
- FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. Oxford University Press, New York. 2011.
- FOELIX, R. F.; CHU-WANG, I.-W. The morphology of spider sensilla II. Chemoreceptors. **Tissue and Cell**, v. 5, n. 3, p. 461-478, 1973a.
- FOELIX, R. F.; CHU-WANG, I.-W. The morphology of spider sensilla I. Mechanoreceptors. **Tissue and Cell**, v. 5, n. 3, p. 451-460, 1973b.
- FOELIX, R. F.; ERB, B.; MICHALIK, P. Scopulate hairs in male *Liphistius* spiders: probable contact chemoreceptors. **Journal of Arachnology**, v. 38, n. 3, p. 599-603, 2010.

FOELIX, R. F.; RAST, B.; PEATTIE, A. M. Silk secretion from tarantula feet revisited: alleged spigots are probably chemoreceptors. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 7, p. 1084-1089, 2012.

FOELIX, R.F.; CHU-WANG, I. W. The structure of scopula hairs in spiders. Proc 6th Int Congr Arachnol, Amsterdam, p 56-58. 1975.

GASKETT, A. C. Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. **Biological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 27-48, 2007.

GHIROTTTO, V. M. Estudo comparativo da corte e cópula de duas espécies de aranhas da família Dipluridae (Araneae, Mygalomorphae). In: Congresso Latino-Americano de Aracnologia, 5. 2017. Caeté. Livro de resumos. Disponível em: https://docs.wixstatic.com/ugd/090f75_1b1accf0c2314926b7aa755b74d3f811.pdf. Acesso em: 31/07/2019.

GOLOBOFF, P. A. A reanalysis of mygalomorph spider families (Araneae). **American Museum Novitates**, 3056: 1-32, 1993.

GUADANUCCI, J.P.L; JURGILAS, J. P.; INDICATTI, R.P.; MIGLIO, L.T. **Evolution of tarsal structures in Mygalomorphae**. In: International Congress of Arachnology, 20., 2016, Golden. Program & Abstracts. Golden. Denver museum of nature & science reports, 2016. p.100.

HOMANN, H. Haften Spinnen an einer Wasserhaut? **Naturwissenschaften**, v. 44, n. 11, p. 318-319, 1957.

LEONARD, A. S.; MORSE, D. H. Line-following preferences of male crab spiders, *Misumena vatia*. **Animal Behaviour**, v. 71, n. 3, p. 717-724, 2006.

NARDI, N. M. **História natural de Ischnothele Annulata (Araneae, Dipluridae), em Cerrado sensu stricto: reprodução, alimentação, fenologia e densidade populacional**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PAPKE, M. D.; RIECHERT, S.E.; SCHULZ, S. An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. **Animal Behaviour**, v. 61, n. 5, p. 877-886, 2001.

PAPKE, M.; SCHULZ, S.; TICHY, H.; MAG, E. G.; EHN, R. Identification of a new sex pheromone from the silk dragline of the tropical wandering spider *Cupiennius salei*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 23, p. 4339-4341, 2000.

PARK, Y. I.; BLAND, J. M.; RAINA, A. K. Factors affecting post-flight behavior in primary reproductives of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of insect physiology**, v. 50, n. 6, p. 539-546, 2004.

PÉREZ-MILES, F.; GUADANUCCI, J.P.L; JURGILAS, J. P.; BECCO, R.; PERAFÁN, C. Morphology and evolution of scopula, pseudoscopula and claw tufts in Mygalomorphae (Araneae). **Zoomorphology**, v. 136, n. 4, p. 435-459, 2017.

PUNZO, F. Use of a Y-maze to assess the response of the giant whipscorpion *Mastigoproctus giganteus* (Arachnida: Uropygi) to olfactory cues associated with a predator, *Hogna carolinensis* (Araneae: Lycosidae). **Bulletin of British Arachnological**, v. 13, n. 5, p. 172, 2005.

RAMÍREZ, M. J. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae: Araneomorphae). **Bulletin of the american Museum of Natural History**, v. 2014, n. 390, p. 1-375, 2014.

RAVEN, R. J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): cladistics and systematics. **Bulletin of the American Museum of Natural History**; v. 182, article 1, 1985.

ROBERTS, J. A.; UETZ, G.W. Species-specificity of chemical signals: silk source affects discrimination in a wolf spider (Araneae: Lycosidae). **Journal of insect behaviour**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2004b.

ROBERTS, J. A.; UETZ, G. W. Chemical signaling in a wolf spider: a test of ethospecies discrimination. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 6, p. 1271-1284, 2004a.

ROBERTS, J. Andrew; UETZ, George W. Information content of female chemical signals in the wolf spider, *Schizocosa ocreata*: male discrimination of reproductive state and receptivity. **Animal Behaviour**, v. 70, n. 1, p. 217-223, 2005.

ROSS, K.; SMITH, R. L. Aspects of the courtship behavior of the black widow spider, *Latrodectus hesperus* (Araneae: Theridiidae), with evidence for the existence of a contact sex pheromone. **Journal of Arachnology**, p. 69-77, 1979.

ROVNER, J. S. Morphological and ethological adaptations for prey capture in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). **Journal of Arachnology**, p. 201-215, 1980.

SEARCY, L. E.; RYPSTRA, A. L.; PERSONS, M. H. Airborne chemical communication in the wolf spider *Pardosa milvina*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 11, p. 2527-2533, 1999.

SCHULZ, S.; TOFT, S. Identification of a sex pheromone from a spider. **Science**, v. 260, n. 5114, p. 1635-1637, 1993.

SCHULZ, S. Spider pheromones—a structural perspective. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 1, p. 1-14, 2013.

SCOTT, C.; MCCANN, S., GRIES, R., KHASKIN, G., GRIES, G. N-3-Methylbutanoyl-O-methylpropanoyl-L-serine methyl ester—pheromone component of western black widow females. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 5, p. 465-472, 2015.

TICHY, H.; GINGL, E.; EHN, R.; PAPKE, M.; SHULZ, S. Female sex pheromone of a wandering spider (*Cupiennius salei*): identification and sensory reception. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 187, n. 1, p. 75-78, 2001.

TRABALON, M; BAGNÈRES, A. Contact recognition pheromones in spiders and scorpions. In: BLOMQUIST, Gary J.; BAGNÈRES, Anne-Geneviève (Ed.). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**. Cambridge University Press, 2010.

TROVA, E. F. **Aspectos da história natural de aranhas-de-alcapão em duas unidades de conservação do Cerrado e Mata Atlântica do sudeste do Brasil.** 2019. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

UETZ, G. W.; STRATTON, G. E. Communication in spiders. **Endeavour**, v. 7, n. 1, p. 13-18, 1983.

WOLFF, J. O.; GORB, S. N. Comparative morphology of pretarsal scopulae in eleven spider families. **Arthropod structure & development**, v. 41, n. 5, p. 419-433, 2012.

WYATT, T. D. **Pheromones and animal behavior:** chemical signals and signatures. Cambridge University Press, 2014.

XIAO, Y.; ZHANG, J.; LI, S. A two-component female-produced pheromone of the spider *Pholcus beijingensis*. **Journal of chemical ecology**, v. 35, n. 7, p. 769, 2009.

CAPÍTULO II

**ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CERDAS
DA PSEUDOESCÓPULA EM UMA ARANHA *Ischnothele annulata* (Ischnothelidae)**

Introdução

Uma vez que as aranhas são indivíduos solitários, agressivos, potenciais predadores canibais e de pouca acuidade visual (TICHY, 2001; GASKETT, 2007; FOELIX, 2011), essas características podem ter favorecido uma forte seleção para comunicações a longa distância, sem a necessidade de contato entre o emissor e o receptor (GASKETT, 2007), como por exemplo a sinalização química, que pode ter sido uma das formas de comunicação mais antigas a ter evoluído entre os aracnídeos (WEYGOLDT, 1977 *apud* FOELIX, 1985). De fato, a fim de evitar comportamentos agonísticos provenientes das fêmeas (como o canibalismo), os machos utilizam vários métodos de comunicação à longa distância durante a corte, como pistas químicas, acústicas/vibratórias e visuais (UETZ, STRATTON, 1983; GASKETT, 2007; FOELIX, 2011). Vários estudos químicos e comportamentais mostram que o uso de feromônios é comum em aranhas (PAPKE *et al.*, 2000, 2001; TICHY, 2001; GASKETT, 2007; BARUFFALDI *et al.*, 2010;), apesar de terem sido quimicamente caracterizados em apenas onze espécies de araneomorfos (FISCHER, 2019).

Para a emissão dos feromônios, as fêmeas podem usar sua cutícula ou teia, mas as emissões através da teia são mais reportadas e estudadas que aquelas pela cutícula. Foi sugerido que a percepção dos feromônios fosse feita por quimiorreceptores, localizados provavelmente nos pedipalpos ou no tarso das pernas dianteiras (GASKETT, 2007). Essa inferência foi feita baseando-se na observação de comportamentos dos machos, que consistiam na manipulação da teia das fêmeas usando os palpos e/ou as pernas dianteiras durante a corte (TIETJEN, 1978; TIETJEN, ROVNER, 1980; GASKETT, 2007; JIAO *et al.*, 2011), comportamento também reportado para migalomorfos (FERRETTI, 2013). Além disso, sabe-se que os aracnídeos possuem seus órgãos sensoriais localizados em suas extremidades, especialmente nos palpos e pernas dianteiras, com uma variedade de mecano e quimiorreceptores (FOELIX, 1985).

A suposta cerda quimiorreceptora responsável pela recepção dos feromônios foi identificada apenas em duas espécies de araneomorfos: *C. salei*, localizada no dorso do pedipalpo de machos (TICHY *et al.*, 2001), e em *Latrodectus hesperus* Chamberlin & Ivie, 1935 (Theridiidae), distribuída em todos segmentos tarsais, e na região ventral de palpos de machos e fêmeas (ROSS, SMITH, 1979). Para se inferir a função de uma sensilla, testes comportamentais ou eletrofisiológicos são necessários (TICHY *et al.*, 2001), além de evidências morfológicas (FOELIX, CHU-WANG, 1973 a,b). No caso de *L. hesperus*, a identificação das cerdas foi feita apenas por micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura (ROSS, SMITH, 1979); enquanto que a função quimiorreceptora das cerdas de *C.*

salei foi testada através de dados eletrofisiológicos e comportamentais utilizando-se da teia das fêmeas, dos machos, e o feromônio sintético das fêmeas (TICHY *et al.*, 2001).

Recentemente, Pérez-Miles *et al.* (2017) reportaram um diferente tipo de cerda exclusiva de machos de migalomorfos, localizadas na região ventral do tarso das pernas. Elas são mais grossas que as demais cerdas tarsais, sub-cônicas, possuem estrias dispostas de forma oblíqua, e a morfologia do seu ápice pode variar de acordo com a família, apresentando um “capuz” subterminal, um “rasgo” longitudinal, um orifício tipo opérculo, um orifício terminal cercado por uma borda franjada, ou ser estendido no ápice por um prolongamento filiforme. Elas podem arranjar-se densamente no tarso, de forma similar ao que ocorre com as cerdas da escópula (neste caso, denominadas pseudoescópula), ou estarem distribuídas de forma esparsa na região ventral do tarso entre outros tipos de cerdas. Elas diferem das cerdas regulares da escópula por conta de sua propriedade não adesiva, inferida pela ausência de microtrícas (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017). Os autores a consideraram uma cerda quimiorreceptora, por conta de sua similaridade com outras cerdas não adesivas reportadas para outras aranhas migalomorfos: um macho de *Idiops pylorus* (FOELIX *et al.*, 2010); e até mesmo outras aranhas migalomorfos (RAMIRÉZ, 2014; BARTH, 1970, 2013 *apud* PÉREZ-MILES *et al.*, 2017) apesar da diferença de disposição no tarso de araneomorfos, localizadas na região dorsal do tarso dos palpos. Além disso, as cerdas sensoriais dos machos também diferem das outras cerdas quimiossensoriais amplamente distribuídas em ambos machos e fêmeas de migalomorfos, que são mais compridas, finas e mais afuniladas (PÉREZ-MILES *et al.*, 2017), ocorrendo na região ventral e dorsal do tarso, entre outras partes do corpo (GUADANUCCI, 2016).

Consequentemente, é plausível supor uma função quimiossensorial para as cerdas da pseudoescópula na biologia reprodutiva do grupo, por conta de sua morfologia, e sua presença apenas em machos, sendo adicionais às cerdas quimiossensoriais encontradas em ambos os sexos. Apesar disso, a investigação dessa estrutura em um nível ultraestrutural poderia fornecer informações adicionais para corroborar uma hipótese funcional, como já foi feito anteriormente para vários grupos: Opiliões (GAINETT, 2017), Ricinulei (TALARICO, 2006, 2008), aranhas (FOELIX, 1970; FOELIX, CHU-WANG, 1973a,b), outros aracnídeos (FOELIX, 1985), e principalmente insetos (ALTNER, PRILLINGER, 1980; KEIL, 2012).

As cerdas sensoriais podem ser divididas em duas categorias: quimiorreceptores e mecanorreceptores, sendo diferenciadas por várias características. Quimiorreceptores (de contato) sempre estão inseridos em um soquete, possuem uma parede relativamente grossa, e lúmen duplo; o lúmen interno contém muitos dendritos, que percorrem toda a haste até uma abertura apical (FOELIX, 1985). Quando comparados com as cerdas táteis, elas são mais curtas

e de menor diâmetro (FOELIX, 1973b). No que se diz respeito às cerdas mecanorreceptoras, os dendritos terminam na base da cerda (FOELIX, 1985) e a grossura da parede cuticular é maior nesta (3 μm), se comparadas às das cerdas quimiorreceptoras (1 μm) (FOELIX, 1970).

Dessa forma, neste trabalho, analisamos por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as cerdas da pseudoescópula em um representante de Mygalomorphae, *Ischnothele annulata* Tullgren, 1905 (Dipluridae). Essa espécie foi escolhida devido à ausência de cerdas adesivas dentre as cerdas da pseudoescópula (escópula mista) (Pérez-Miles *et al.*, 2017), o que diminui a interferência de outros tipos de cerda na análise.

Objetivos

Analisar, por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) a ultra-estrutura das cerdas da recém descrita “pseudoescópula”, encontrada nas pernas de machos de aranhas Mygalomorphae, procurando por evidências de atividade quimiorreceptora.

Material e Métodos

A fim de analisar as cerdas da pseudoescópula por MET, foram testados 3 protocolos que compreendem as etapas de dissecação e fixação, inclusão em resina e contraste do material, descritas abaixo. Após a inclusão, o material foi cortado em micrótomo com auxílio de lâmina de vidro (protocolo 1), ou diamante (protocolos 2 e 3). Todos protocolos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia (Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro), porém, uma vez que o Microscópio Eletrônico de Transmissão deste local se encontra desativado para manutenção desde o final de 2017 sem previsão para reparo, foi necessária a realização da análise das imagens em outras instituições de pesquisa.

A primeira metodologia para MET foi analisada no Lab. de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química de São Carlos – USP (LME-IQSC) com o equipamento JEOL, modelo JEM2100 LaB6 200 kV, utilizando-se a voltagem de 80 kV para a análise. A segunda e terceira, no Lab. de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP com o equipamento Zeiss EM 900, utilizando-se a voltagem de 60 kV para a análise.

Protocolos para fixação, inclusão e contraste de material para MET

- 1) Epon Araldite – glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M

Fixação: os tarsos I e IV foram removidos de animais vivos e colocadas em fixador Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. O material foi mantido refrigerado em geladeira por 3 dias até as próximas etapas.

Lavagem: o fixador foi descartado e foram feitas duas lavagens com tampão fosfato salino (PBS – Phosphate buffered saline), por 15 minutos cada.

Pós-fixação: o tampão foi descartado e trocado por Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, permanecendo por 2 horas no escuro.

Lavagem: o tetróxido de ósmio foi descartado e foram feitas duas lavagens com PBS, por 15 minutos cada. Em seguida, o PBS foi descartado e o material permaneceu por 15 minutos em álcool 10%.

Contraste: o material foi mantido no escuro com acetato de uranila em álcool 10% por um período de 3 horas.

Desidratação: material passou pelo processo de desidratação com porcentagens crescentes de acetona (50%, 75%, 90%, 95% e duas vezes em acetona P.A.) por 5 minutos cada.

Inclusão: o material é colocado em solução de resina (Epon-Araldite) com catalizador conforme a tabela abaixo:

Proporção	Tempo
Acetona + resina (reutilizada) com catalizador (1:1)	12hrs aprox.
Resina pura + 4 gotas de catalizador	24 horas
Posteriormente, a estufa é ligada a 70°C por 24 a 48 horas.	

2) Spurr – glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M

Fixação: os tarsos IV foram removidos de exemplares vivos, lavados em ultrassom, e as cerdas da região dorsal do tarso que não eram o alvo da análise, foram removidas. Os tarsos foram cortados em 2 a 3 pedaços não maiores que 1 mm e mantidos refrigerados em fixador Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M por cerca de 1-2 meses até as próximas etapas.

Lavagem: o fixador é descartado e a lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1M foi feita duas vezes, por 15 minutos cada.

Pós-fixação: o tampão é descartado e trocado por Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. O material é mantido por 2 horas em uma caixa, no escuro.

Lavagem: o tetróxido de ósmio é descartado e são feitas duas lavagens com cacodilato de sódio 0,1M, por 15 minutos cada. Em seguida, a solução foi descartada e o material permaneceu por 15 minutos em álcool 10%.

Desidratação: o material passa pelo processo de desidratação em porcentagens crescentes de álcool (50%, 70%, 95% e três vezes em 100%) por 15 minutos cada.

Inclusão: o álcool foi descartado e o material foi colocado em solução com resina (Spurr) e álcool P.A. em diferentes concentrações, conforme tabela abaixo:

Proporção (álcool/spurr)	Quantidades (álcool/spurr)	Tempo
(2:1)	1 ml álcool / 0,5 Spurr	4 horas
(1:1)	1 ml álcool / 1 ml Spurr	overnight
(1:3)	0,5 ml álcool / 1,5 ml Spurr	7 horas
Resina 100%	resina 100%	overnight

Posteriormente, o material é colocado em estufa a 70°C por 24 horas.

3) Spurr – Karnovsky modificado

A metodologia descrita a seguir foi modificada a partir de Gainett *et al.* (2017).

Fixação: os tarsos IV foram removidos de exemplares vivos, e as cerdas da região dorsal do tarso que não eram o alvo da análise, foram removidas. Os tarsos foram cortados em 3 a 4 pedaços não maiores que 1 mm e mantidos refrigerados em fixador Karnovsky modificado (receita abaixo) por cerca de 1-2 meses até as próximas etapas.

Lavagem: o fixador foi descartado e foram feitas duas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 15 minutos cada.

Pós-fixação: o tampão foi descartado e trocado por Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, permanecendo nesta solução por 2 horas dentro do refrigerador.

Lavagem: o tetróxido de ósmio foi descartado e foram feitas duas lavagens com cacodilato de sódio 0,1M, por 15 minutos cada.

Desidratação: o material passa pelo processo de desidratação em porcentagens crescentes de álcool (50%, 70%, 95% e três vezes em 100%) por 15 minutos cada.

Inclusão: o álcool foi descartado e o material foi colocado em solução com resina e álcool em diferentes concentrações, conforme tabela abaixo:

Proporção	Quantidades	Tempo
-----------	-------------	-------

Álcool 100% / resina (2:1)	1 ml álcool / 0,5 Spurr	4 horas
Álcool 100% / resina (1:1)	1 ml álcool / 1 ml Spurr	overnight
Álcool 100% / resina (1:3)	0,5 ml álcool / 1,5 ml Spurr	7 horas
Resina 100%	resina 100%	overnight

Posteriormente, o material é colocado em estufa a 70°C por 24 horas.

Receita química – Fixador Karnovsky modificado

A receita química descrita a seguir foi obtida a partir de Gainett (2016)

Componentes:

- Tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato monossódico dihidratado - sodium dihydrogen orthophosphate)
- Paraformaldeído
- Glutaraldeído
- NaOH
- Glicose ou Frutose

Solução A: 11.3 g (2,6%) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dissolver e completar com 500 ml de água destilada.

Solução B: 2,52 g (2,52%) de NaOH, dissolver e completar com 100 ml de água destilada.

Solução de Tampão (para dissecação): pegar 83 ml da solução A mais 17 ml da solução B, levar a pH 7,3 com HCl ou mais gotas de NaOH se necessário. Note que o tampão (mesmo se mantido permanentemente na geladeira) tem um curto período de validade, no máximo 1-2 semanas.

Procedimento de fixação: dissolver 2 g de paraformaldeído em 17 ml da solução B em um banho maria com temperatura não excedendo os 70 graus. Quando completamente dissolvido, adicionar solução A e conteúdo de 10 ml de 25% glutaraldeído a um volume final de 100 ml, ajuste o valor de pH em 7,3 e após, adicione 1,5 g de d-glicose ou frutose por 100 ml para acertar a osmolaridade.

Resultados e discussão

No que se refere aos diferentes protocolos de Microscopia Eletrônica de Transmissão utilizados neste trabalho, as duas primeiras metodologias de preparação não foram suficientemente adequadas para a análise do material. O primeiro protocolo não foi ideal devido à resina utilizada (Epon-Araldite), que não aderiu satisfatoriamente bem ao material, ocasionando problemas nas etapas de corte em micrótomo. Nesse caso, o material se destacava completamente da resina, ou então ficava demasiadamente grosso e conseqüentemente muito elétron-denso, impossibilitando a visualização das estruturas internas à cerda. A segunda metodologia não foi ideal devido ao fixador utilizado, que não manteve a integridade das estruturas internas, impossibilitando sua visualização durante a análise em MET.

A terceira metodologia, que utiliza um tipo de fixador mais indicado para espécimes de cutícula grossa, mostrou-se mais eficaz para a fixação do material, no entanto, as estruturas internas ainda não se encontram em seu melhor grau de preservação. Apesar disso, foi possível observar a organização das estruturas na região interna da cerda. As micrografias mostram que, de maneira geral, a cerda apresenta um lúmen duplo, sendo possível distinguir a parede da cerda (pc), e um canal central (cc) envolto por um espesso tubo cuticular (tc). No que se refere ao aspecto externo, as estrias da cerda aparecem em menor quantidade e são mais marcadas na região apical, e, em corte transversal, dão uma aparência serrilhada à parede da cerda (figs. 1 e 2), quando comparada com a região basal (figs. 5 e 6).

Na região basal, a parede da cerda tem grossura aproximada de 1 μm , e o tubo cuticular 0,66 μm . No canal central, é possível visualizar aproximadamente 13 estruturas circulares de aproximadamente 0,46 μm . Conforme vamos nos aproximando da região apical, a parede da cerda e o tubo cuticular tem espessuras menores, de aproximadamente 0,5 μm e 0,26 μm respectivamente. As estruturas circulares presentes também são menores, com aproximadamente 0,15 μm , e encontram-se em maior quantidade (fig. 2). As treze estruturas circulares da base representam a bainha dendrítica, onde estariam dispostos internamente os dendritos, que não estão visíveis nas micrografias, mas que seriam possivelmente as estruturas circulares menores encontradas nas figuras 1 a 4. Conforme os dendritos chegam na região apical, não é mais possível observar a bainha dendrítica (figs. 1 e 2), e os dendritos ocupam todo o lúmen (apenas visível na fig. 2).

Tanto a organização geral da cerda, com presença de um canal central envolto por um tubo cuticular, quanto a diminuição da grossura dessas estruturas ao nos aproximarmos da região apical da cerda, além da falta da bainha dendrítica nessa região, são compatíveis com

outras descrições de cerdas quimiossensoriais em aranhas (FOELIX, CHU-WANG, 1973b; FOELIX, 1985; FOELIX, ERB, MICHALIK, 2010). Estes dados, aliados às características morfológicas da cerda, como a presença de poro subapical, ligeiro formato em “S”, presença de estrias, menor tamanho e dispostas em uma maior inclinação quando comparada às cerdas táteis, e aos resultados obtidos no capítulo anterior de que a obstrução das cerdas da pseudoescópula impossibilita ou dificulta o reconhecimento da teia das fêmeas, por parte dos machos, parece indicar que esta estrutura é uma sensilla quimiossensorial, com função chave no reconhecimento intraespecífico e na biologia reprodutiva desses organismos.

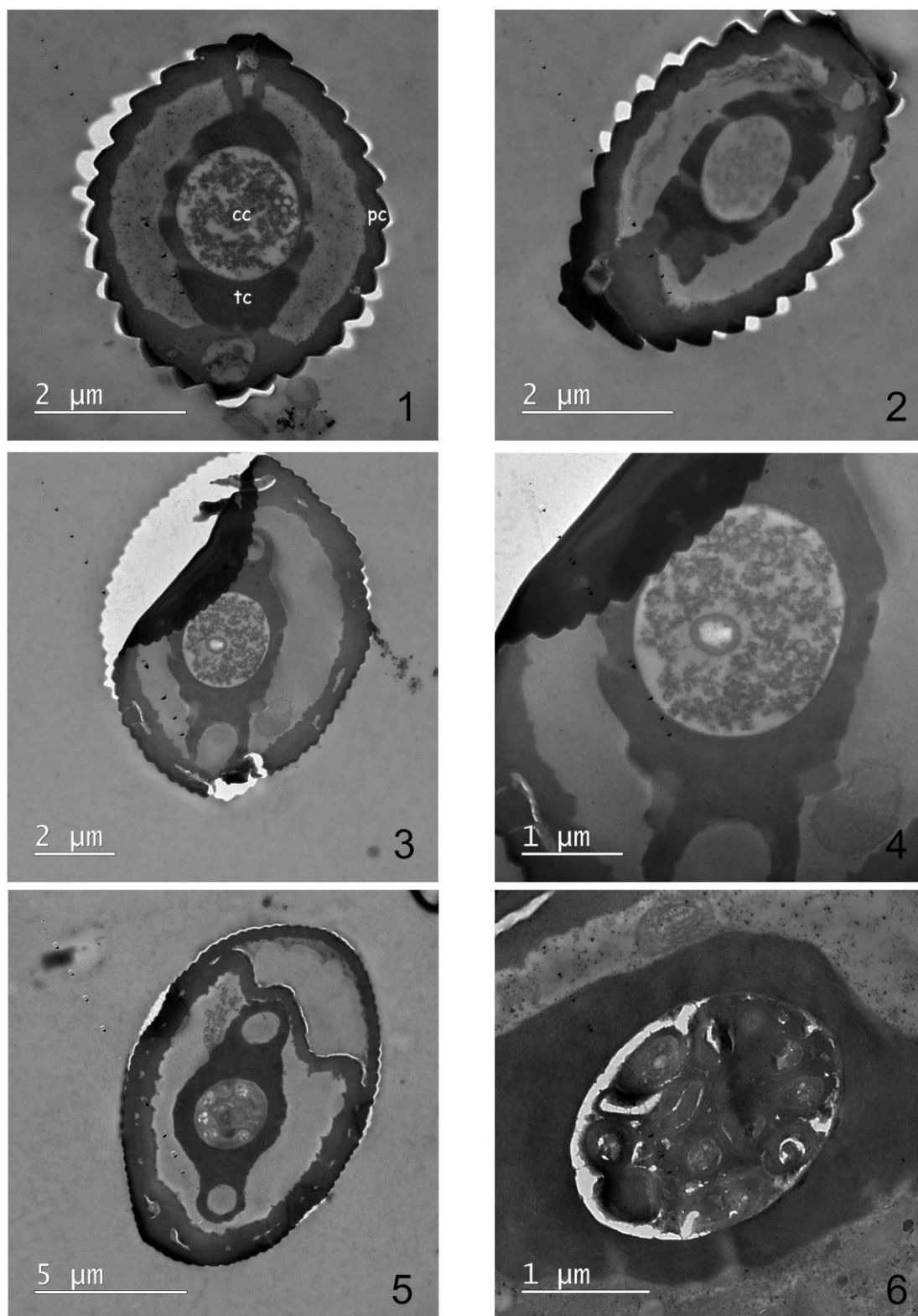


Figura 1-6. Micrografias das cerdas da pseudoescópula, cortes transversais (Microscopia Eletrônica de Transmissão). 1-2. Corte na região apical da cerda. 3,4. Corte na região mediana da cerda. 5,6. Corte na região basal da cerda. Cc = canal central. Pc = parede da cerda. Tc = tubo cuticular.

Referências

- ALTNER, H., PRILLINGER, L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *In: International Review of Cytology*. Academic Press, 1980. p. 69-139.
- BARTH, F. G. Feinstruktur des Spinneninteguments. II. Die raumliche Anordnung der Mikrofasern in der lamellierten Cuticula und ihre Beziehung zur Gestalt der Porenkanäle (Cupiennius salei Keys., adult, hautungsfer, Tarsus). **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, 1970.
- BARTH, F. G. **Sinne und Verhalten**: aus dem Leben einer Spinne. Springer-Verlag, 2013.
- BARUFFALDI, L. COSTA, F. G., RODRÍGUEZ, A. & GONZÁLEZ, A. Chemical communication in Schizocosa malitiosa: evidence of a female contact sex pheromone and persistence in the field. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 7, p. 759-767, 2010.
- FERRETTI, N., POMPOZZI, G., COPPERI, S., GONZÁLEZ, A., & PÉREZ-MILES, F. Sexual behaviour of mygalomorph spiders: when simplicity becomes complex; an update of the last 21 years. **Arachnology**, v. 16, n. 3, p. 85-94, 2013.
- FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. Oxford University Press, New York. 2011.
- FOELIX, R. F. Chemosensitive hairs in spiders. **Journal of Morphology**, v. 132, n. 3, p. 313-333, 1970.
- FOELIX, R. F. Mechano- and chemoreceptive Sensilla. *In: Neurobiology of arachnids*. Springer Berlin Heidelberg, p. 118-137, 1985.
- FOELIX, R. F.; CHU-WANG, I.-W. The morphology of spider sensilla I. Mechanoreceptors. **Tissue and Cell**, v. 5, n. 3, p. 451-460, 1973a.
- FOELIX, R. F.; CHU-WANG, I.-W. The morphology of spider sensilla II. Chemoreceptors. **Tissue and Cell**, v. 5, n. 3, p. 461-478, 1973b.
- FOELIX, R. F.; ERB, B.; MICHALIK, P. Scopulate hairs in male Liphistius spiders: probable contact chemoreceptors. **Journal of Arachnology**, v. 38, n. 3, p. 599-603, 2010.
- GAINETT, G. **Estruturas sensoriais tarsais de opiliões (Arachnida, Opiliones)**: morfologia funcional, evolução e uso em sistemática. 2016. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- GAINETT, G.; MICHELIK, P.; MULLER, C.H.; GRIBET, G.; TALARICO, G.; WILLERMART, R. H. Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). **Arthropod structure & development**, v. 46, n. 2, p. 178-195, 2017.
- GASKETT, A. C. Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. **Biological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 27-48, 2007.

- GUADANUCCI, J.P.L.; JURGILAS, J. P.; INDICATTI, R.P.; MIGLIO, L.T. Evolution of tarsal structures in Mygalomorphae. *In: International Congress of Archnology*, 20., 2016, Golden. Program & Abstracts. Golden. Denver museum of nature & science reports, 2016. p.100.
- JIAO, X., CHEN, Z., DU, H., CHEN, J., LIU, F. Chemoreceptors distribution and relative importance of male forelegs and palps in intersexual chemical communication of the wolf spider *Pardosa astrigera*. **Chemoecology**, v. 21, n. 1, p. 45-49, 2011.
- KEIL, T. A. Sensory cilia in arthropods. **Arthropod structure & development**, v. 41, n. 6, p. 515-534, 2012.
- PAPKE, M. D.; RIECHERT, S.E.; SCHULZ, S. An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. **Animal Behaviour**, v. 61, n. 5, p. 877-886, 2001.
- PAPKE, M.; SCHULZ, S.; TICHY, H.; MAGLE, E. G.; EHN, R. Identification of a new sex pheromone from the silk dragline of the tropical wandering spider *Cupiennius salei*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 23, p. 4339-4341, 2000.
- PÉREZ-MILES, F.; GUADANUCCI, J.P.L.; JURGILAS, J. P.; BECCO, R.; PERAFÁN, C. Morphology and evolution of scopula, pseudoscopula and claw tufts in Mygalomorphae (Araneae). **Zoomorphology**, v. 136, n. 4, p. 435-459, 2017.
- RAMÍREZ, M. J. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae, Areneomorphae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 2014, n. 390, p. 1-375, 2014.
- ROSS, K.; SMITH, R. L. Aspects of the courtship behavior of the black widow spider, *Latrodectus hesperus* (Araneae: Theridiidae), with evidence for the existence of a contact sex pheromone. **Journal of Arachnology**, p. 69-77, 1979.
- SCHULZ, S. Spider pheromones—a structural perspective. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 1, p. 1-14, 2013.
- TALARICO, G.; PALACIOS-VARGAS, J. G.; ALBERTI, G. The pedipalp of *Pseudocellus pearsei* (Ricinulei, Arachnida)—ultrastructure of a multifunctional organ. **Arthropod structure & development**, v. 37, n. 6, p. 511-521, 2008.
- TALARICO, G.; PALACIOS-VARGAS, J. G.; FUENTES SILVA, M.; ALBERTI, G. Ultrastructure of tarsal sensilla and other integument structures of two *Pseudocellus* species (Ricinulei, Arachnida). **Journal of Morphology**, v. 267, n. 4, p. 441-463, 2006.
- TICHY, H.; GINGL, E.; EHN, R.; PAPKE, M.; SCHULZ, S. Female sex pheromone of a wandering spider (*Cupiennius salei*): identification and sensory reception. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 187, n. 1, p. 75-78, 2001.
- TIETJEN, W. J. Is the sex pheromone of *Lycosa rabida* (Araneae: Lycosidae) deposited on a substratum? **Journal of Arachnology**, p. 207-212, 1978.

TIETJEN, W.J.; ROVNER, J. S. Trall-following behaviour in two species of wolf spiders: Sensory and etho-ecological concomitants. **Animal Behaviour**, v. 28, n. 3, p. 735-741, 1980.

UETZ, G. W.; STRATTON, G. E. Communication in spiders. **Endeavour**, v. 7, n. 1, p. 13-18, 1983.

WEYGOLDT, P. **Communication in crustaceans and arachnids**. How animals communicate. Indiana University Press, Bloomington, p. 303-333, 1977.