

**Serenata de contacto: Efecto del cortejo copulatorio sobre
el éxito de cópula en el opilión *Pachyloides thorellii*
(Opiliones, Gonyleptidae)**

Lic. Estefanía Stanley Amado

*Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Ministerio de Educación y Cultura*

Orientadora: Dra. Anita Aisenberg

*Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución; Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable; Ministerio de Educación y Cultura*

Co-Orientador: Dr. Glauco Machado

Departamento de Ecología; Instituto de Biociencias; Universidad de San Pablo

Tesis de Maestría

PEDECIBA-Biología

Sub-Área Zoología

2018

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
Marco teórico	8
Organismo de estudio	11
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 1: “Dialogando, ¿se llega al éxito?: Interacción macho-hembra durante la cópula en <i>Pachyloides thorellii</i> (Opiliones, Gonyleptidae)”	
Introducción	21
Metodología	23
<i>Cría y mantenimiento de ejemplares</i>	23
<i>Observaciones comportamentales</i>	25
<i>Análisis estadísticos</i>	27
Resultados	28
Discusión	38
Conclusiones	45
CAPÍTULO 2: “Efecto del cortejo copulatorio sobre el éxito de cópula en <i>Pachyloides thorellii</i> (Opiliones, Gonyleptidae)”	
Introducción	47
Metodología	52
<i>Cría y mantenimiento de ejemplares</i>	52
<i>Experiencias comportamentales</i>	52
<i>Disección y conteo de espermatozoides</i>	57
<i>Análisis estadísticos</i>	59
Resultados	62
<i>Aceptación de cópula</i>	62
<i>Aceptación de segundas cópulas</i>	65
<i>Duración de cópula</i>	66
<i>Conteo de espermatozoides</i>	69
Discusión	72

<i>Modificación de estructuras</i>	72
<i>Cortejo pre-copulatorio y éxito de cópula</i>	74
<i>Aceptación de segundas cópulas</i>	76
<i>Cópula y conteo de espermatozoides</i>	78
Conclusiones	84
CONCLUSIONES GENERALES Y ESTUDIOS FUTUROS	86
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXO	103
Resúmenes presentados en jornadas y congresos	103
<u>Efecto del cortejo en el éxito de cópula del opilión <i>Pachyloides thorellii</i></u> <u>(Opiliones, Gonyleptidae)</u>	103
<u>Serenata de contacto: Efecto del cortejo en el éxito de cópula en</u> <u><i>Pachyloides thorellii</i> (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae)</u>	104
<u>Sistemas de apareamiento en opiliones: historia de una pasión</u>	105
<u>Dialogando, ¿se llega al éxito?: Interacción macho-hembra durante la</u> <u>cópula en <i>Pachyloides thorellii</i> (Opiliones, Gonyleptidae)</u>	106

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) por permitirme realizar este posgrado y otorgarme financiación para la compra de materiales y para asistir a pasantías, cursos y congresos a lo largo de él. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo financiero a este proyecto que me permitió dedicarme por completo a investigar.

También agradezco a los miembros del tribunal, Dr. Fernando Perez-Miles, Dra. Macarena González y Dr. David Vrech, por el apoyo y la paciencia a lo largo de esta última etapa y por los aportes y comentarios que mejoraron este trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, especialmente al Dr. Alfredo Peretti por recibirme y al Dr. David Vrech por permitirme realizar los análisis preliminares para desarrollar el protocolo de conteo de espermatozoides. Agradezco también a la Dra. Analía Richeri del Laboratorio de Biología Celular del IIBCE, por permitirme utilizar el equipamiento para realizar el conteo de espermatozoides.

Me gustaría agradecer especialmente a mi Orientadora Dra. Anita Aisenberg y a mi Co-Orientador Dr. Glauco Machado. Compartir esta etapa con ambos fue increíble y lo que pueda escribir no le hace justicia a lo que me dieron, me enseñaron a ver lo que puedo hacer y me alentaron a hacerlo. Anita, gracias por el apoyo, los conocimientos, por el tiempo, por los límites y sobre todo por siempre creer en mi y apostar a que uno puede lo que quiere. Glauco, gracias por mostrarme y recordarme lo fantástico que es el opiliomundo, por reconocer

mis debilidades y ayudarme a hacerme más fuerte con ellas, por la dedicación y por estar cada vez que te necesité.

Gracias a todo el Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Los compañeros de antes que siguieron su camino (...pero que nunca dejan de ser parte) y los presentes, que de una manera u otra me apoyaron y ayudaron a lo largo de este proyecto. A Laura, Lorena, Mariana, Macarena, Rodrigo, Carlos y Anita por ayudarme a cuidar a los opiliones, a hacer las experiencias, a llenar formularios, a redactar cartas, a pedir plata, a hacer bulling, a escribir artículos, a hacer y practicar presentaciones y más que nada gracias porque hicieron que todo eso fuera divertido. A Fernando G. Costa y a Carlos A. Toscano-Gadea por “haberme mostrado el placer y valor de poder hacer lo que a uno más le gusta” y por ser los embajadores a un mundo de “sexo y violencia” que me mantiene investigando cada vez con más ganas desde hace 10 años.

Le agradezco inmensamente a mi familia y a mis amigos que, si bien creo que todavía no tienen idea lo que hago, dejaron de matar arañas por mi y me siguen apoyando y alegrando a cada paso. A mis padres y a mi hermana, por seguir enseñándome a ser mejor y acompañándome incondicionalmente por este camino. A Sebastián por hacer esto conmigo. Por ser mi amor, mi apoyo, mi hincha número uno, mi mayor crítico, mi mejor amigo...en fin, por ser mi compañero de vida. Y finalmente te agradezco otra vez a vos abuelo, porque me siento felizmente más curiosa que antes y sigo viendo y descubriendo que lo más simple está lleno de cosas increíbles.

Porque lo que uno hace acá, nunca lo hace solo...Gracias!

RESUMEN

En especies poliándricas el éxito reproductivo puede verse afectado por mecanismos de selección sexual post-copulatoria, como la competencia espermática y la elección críptica femenina. El cortejo masculino y las respuestas femeninas antes y durante la cópula son rasgos a través de los cuales se puede evidenciar y estimar la importancia de cada mecanismo. En este trabajo, se evaluaron los efectos del cortejo masculino en el éxito de cópula y la transferencia espermática en una especie de opilión, *Pachyloides thorellii*, en la cual se observa un conspicuo cortejo táctil antes y durante la cópula. Se pusieron a prueba las siguientes hipótesis: (1) los comportamientos de cortejo masculino se relacionan con comportamientos de aceptación o rechazo femeninos; (2) el cortejo masculino pre-copulatorio aumenta la aceptación de la cópula; (3) cortejos copulatorios más intensos y cópulas más prolongadas permiten una mayor transferencia de espermatozoides. Se crearon dos grupos experimentales: 'Machos Tratados' (MT), con la capacidad de cortejar limitada y 'Hembras Tratadas' (HT), con la capacidad de percibir el cortejo táctil masculino reducida. Se enfrentaron cada pareja dos veces, una vez con uno de sus integrantes bajo tratamiento (MT o HT) y otra con ambos individuos libres de tratamiento. Se filmó cada experiencia y se cuantificó la existencia y características del cortejo y la cópula. Luego de las experiencias y de ocurrir cópula, se realizó conteo de espermatozoides en los receptáculos seminales femeninos. Observamos comportamientos que sugieren un flujo de información entre macho y hembra durante la cópula. La intensidad del cortejo copulatorio táctil aumenta el éxito de cópula y la duración de la misma. No se encontró una

relación directa entre el cortejo copulatorio táctil y la transferencia de espermatozoides. Sin embargo, cortejos más intensos llevaron a cópulas más largas y se cuantificaron más espermatozoides en hembras que tuvieron cópulas de mayor duración. En conclusión, el cortejo táctil parece ser un rasgo importante al momento de acceder y mantener la cópula. Adicionalmente, la elección críptica femenina parece tener un rol importante entre los posibles mecanismos de selección sexual post-copulatoria actuando en esta especie de opilión.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Marco teórico

La selección sexual es un conjunto de fuerzas evolutivas que actúa sobre hembras y machos favoreciendo rasgos que les permiten obtener el mayor éxito reproductivo posible (Darwin 1871; Andersson 1994). Los rasgos que se vean favorecidos van a depender del contexto ecológico en el que cada organismo se encuentre, así como de su historia de vida. La combinación de estos elementos resulta en la enorme variedad de estrategias reproductivas que observamos en la naturaleza (Andersson 1994). Dichas estrategias se encuentran enmarcadas a su vez en sistemas de apareamiento, y es a través de la descripción y análisis de estos sistemas que podemos estudiar la magnitud, dirección y consecuencias que tiene la selección sexual en los diferentes grupos de seres vivos (Emlen & Oring 1977; Shuster & Wade 2003).

Los sistemas de apareamiento se pueden dividir, de manera muy general, en monogamia y poligamia. La presencia de uno u otro sistema está ligada a la capacidad de cada sexo de monopolizar apareamientos, que a su vez depende de factores como la distribución espacial y temporal de los recursos, así como de la proporción de individuos de cada sexo y del costo del cuidado parental (Emlen & Oring 1977; Shuster & Wade 2003). En contextos donde los recursos están distribuidos uniformemente, la proporción de individuos de cada sexo con el potencial de reproducirse es similar y/o el cuidado parental es costoso, la posibilidad de monopolizar miembros del sexo opuesto directamente o por medio del control de recursos se reduce y la monogamia se ve favorecida. Por otra parte, cuando los recursos están agrupados, la proporción de individuos de cada

sexo con potencial de reproducirse está sesgada hacia un sexo y/o los requerimientos de la descendencia pueden ser atendidos solamente por un individuo parental o ninguno, se favorecen sistemas de apareamiento poligámicos (Emlen & Oring 1977; Shuster & Wade 2003).

En especies poligámicas en las que las hembras tienen acceso a múltiples apareamientos, el esperma de dos o más machos puede coexistir dentro del tracto reproductivo femenino, permitiendo que la selección sexual opere no solo a través de los mecanismos pre-copulatorios de selección, sino además a través de mecanismos post-copulatorios como la competencia espermática y la elección críptica femenina (Parker 1970; Thornhill 1983; Eberhard 1996). La competencia espermática se define como la competencia entre el esperma de dos o más machos por la fertilización de un determinado conjunto de gametos femeninos (Birkhead & Møller 1998). La elección críptica femenina implica procesos parcial o completamente controlados por la hembra, que ocurren durante el apareamiento o luego del apareamiento y que selectivamente favorecen la paternidad de un macho en detrimento de otro (Eberhard 1996). Si bien son procesos diferentes, ambos ocurren dentro del tracto reproductivo femenino, por lo que los rasgos o cambios en la hembra pueden afectar las condiciones en las que se da la competencia espermática, así como mecanismos de competencia entre esperma pueden desencadenar también mecanismos de selección de machos por parte de las hembras (Eberhard 2000, 2015).

Hay más de 20 mecanismos por los cuales las hembras podrían sesgar la paternidad de su cría. Algunos ejemplos de estos procesos son: (1) prevención de la eyaculación y de una penetración profunda, (2) interrupción prematura de la cópula, (3) falta de transporte de esperma para las regiones del tracto

reproductivo donde ocurre la fertilización, (4) eyección o retención de esperma de un determinado macho, (5) digestión de esperma, (6) nutrición diferencial del esperma almacenado, (7) uso sesgado del esperma almacenado, (8) fusión selectiva con esperma que ha alcanzado el ovocito, (9) transporte o no del esperma de un macho a un lugar donde otro macho pueda removerlo o desactivarlo, (10) falta de ovulación, (11) detención de la preparación del útero para la implantación del óvulo y (12) abortos sesgados (Eberhard 1996). A su vez, cualquier característica que el macho presente que le permita ser elegido por las hembras aumentará su probabilidad de paternidad (Eberhard & Huber 1998; Eberhard 2015).

Los movimientos estimulatorios no asociados a la inseminación *per se* que los machos realizan durante la transferencia de esperma (conocidos como 'cortejo copulatorio') permiten evidenciar indirectamente la presencia de elección críptica femenina (Eberhard 1994). Dicha característica, junto con la presencia de estructuras ornamentadas especializadas para contactar a la hembra y que divergen rápidamente entre especies emparentadas, permiten seleccionar grupos donde demostrar la acción de la elección críptica femenina sobre el éxito reproductivo de los machos (Eberhard 2015). De hecho, se ha encontrado y descrito cortejo copulatorio en muchas especies de diferentes grupos animales (Eberhard 1991, 2015). Sin embargo, demostrar la presencia de elección críptica femenina es más complejo y menos común, ya que requiere encontrar una relación entre el cortejo masculino y la proporción de descendientes que un macho obtiene con una hembra que ya copuló o copulará con otros machos (Eberhard 1985, 1996, 2015).

En la mayor parte de las especies de artrópodos encontramos machos con estructuras ornamentadas que divergen rápidamente y cuyos movimientos durante la cópula no están asociados a la inseminación propiamente dicha (Eberhard 1991, 1994; revisado en Peretti & Aisenberg 2015). Además, su canal de comunicación durante la cópula es mayoritariamente táctil, lo cual permite poner a prueba de manera específica los comportamientos y las estructuras asociadas a ellos (Eberhard 2009, 2015). Según la hipótesis de elección críptica femenina, el efecto del cortejo copulatorio sobre el éxito reproductivo se puede evidenciar a través de experimentos en los que se modifican las estructuras responsables de estos comportamientos para luego registrar la respuesta femenina a dichas modificaciones (ver ejemplos en: Takami 2003; Briceño & Eberhard 2009a,b; Polak & Rashed 2009; Aisenberg et al. 2015; Evandersson & Arnqvist 2016). Sin embargo, generalmente se modifican únicamente las estructuras masculinas, desatendiendo el rol de la percepción femenina del estímulo (Eberhard 2011). En la araña orbitelar *Leucauge mariana* y en la mosca tse tse *Glossina morsitans*, por ejemplo, se observó que el efecto de la manipulación de las estructuras femeninas implicadas en la percepción de los estímulos masculinos durante el cortejo copulatorio es más drástico sobre la elección por parte de la hembra que la modificación de las estructuras estimuladoras masculinas en sí (Briceño & Eberhard 2009b; Aisenberg et al. 2015).

Organismo de estudio

El orden Opiliones es el tercero más diverso dentro de los arácnidos, con aproximadamente 6.500 especies descritas, distribuidas por todos los

continentes excepto la Antártida (Kury 2015). Debido a que no tienen un mecanismo muy eficiente para evitar la pérdida de agua, son encontrados principalmente en ambientes húmedos, con escasa luz y que presentan temperaturas de moderadas a altas (Curtis & Machado 2007; Santos 2007). Son de hábitos crepusculares y/o nocturnos y se los clasifica como omnívoros ya que pueden preñar sobre pequeños artrópodos y otros invertebrados de tegumento blando, alimentarse de carroña o de restos vegetales y hongos (Acosta & Machado 2007).

Taxonómicamente, los Opiliones están divididos en tres subórdenes con representantes vivos: Cyphophthalmi, Palpatores y Laniatores (Fernández et al. 2017). El suborden Cyphophthalmi es grupo hermano de todos los demás y el menos numeroso de los subórdenes, con cerca de 190 especies (Kury 2015). Sus integrantes se caracterizan por transferir el esperma a través de un espermatóforo (Karaman 2005). Los restantes dos subórdenes conforman el clado Phalangida, que se caracteriza por la presencia de genitalia intromitente en los machos (Shultz & Pinto-da-Rocha 2007). El suborden Palpatores está compuesto por los clados: Dyspnoi y Eupnoi (Shultz & Reiger 2001; Fernández et al. 2017). Dyspnoi incluye cerca de 400 especies cuyo comportamiento sexual presenta algunas particularidades, como cópulas en posición ventral (*belly-to-belly*) en la familia Trogilodae (Pabst 1953) y cópulas con entrega de regalos nupciales por parte del macho a través de sus quelíceros en la familia Ischyropsalididae (Martens 1969). El clado Eupnoi (ca. 1800 especies) y el suborden Laniatores (ca. 4200 especies) comprenden el 90% de la diversidad de especies conocidas para el orden (Kury 2015) y concentran la mayoría de los estudios sobre comportamiento, con enorme variedad de tácticas reproductivas

(revisado en Machado et al. 2015).

Los integrantes del clado Phalangida son modelos muy atractivos para el estudio de procesos de selección sexual pues son especies poliginándricas, o sea, tanto machos como hembras se aparean con más de un miembro del sexo opuesto durante el período reproductor (Machado & Macías-Ordóñez 2007; Machado et al. 2015). Los machos presentan un órgano copulatorio intromitente (pene), mientras que las hembras poseen un órgano eversible (ovipositor) con una serie de sacos en el extremo donde son capaces de almacenar esperma (Macías-Ordóñez et al. 2010; Fig. 1).

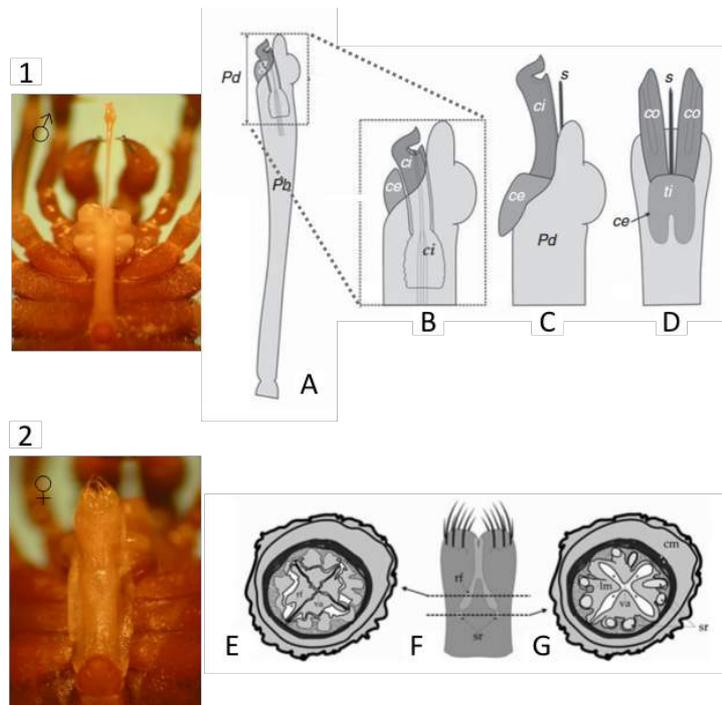


Figura 1. Esquema de aparatos genitales masculino y femenino en Laniatores. 1. Pene evertido de macho de *Pachyloides thorellii* (Gonyleptidae). (A-D) Esquema de la morfología general de la genitalia masculina en el Infraorden Grassatores. (A) Vista del *pars basalis* (Pb), *pars distalis* (Pd) y glande (g). (B) Detalle del *pars distalis* (Grassatores: Biantidae) donde se observa la cápsula interna (ci) y la capsula externa (ce). (C, D) La cápsula interna se abre por presión hidráulica y expone los conductores (co) y el estilo (s): (C) vista lateral y (D) vista frontal. 2. Ovipositor evertido de hembra de *P. thorellii*. (F) Esquema de ovipositor en *Bishopella laciniosa* (Grassatores: Phalangodidae). (E, G) Corte transversal del ovipositor a diferentes alturas mostrando la vagina (va) en forma de X y los receptáculos seminales en posición radial (sr), envoltura del anillo (rf), músculos longitudinales (lm) y músculos circulares (cm). Los conductores abren el lumen del ovipositor para que el estilo penetre y deposite el esperma. Imágenes modificadas de Martens et al. (1981) y Macías-Ordóñez et al. (2010).

En las últimas décadas el comportamiento reproductivo de Opiliones ha sido más estudiado en el Neotrópico que en otras partes del mundo (Buzatto et al. 2013), principalmente las especies del suborden Laniatores, que son particularmente abundantes en esta región. Esto ha permitido establecer ciertas generalidades sobre los sistemas de apareamiento del orden. Para miembros de los subórdenes Cyphophthalmi y Palpatores, el sistema de apareamiento predominante es la poligamia del tipo *scramble competition*, donde tanto machos como hembras se aparean varias veces y la competencia se basa en la habilidad de movilizarse y localizar parejas (Machado et al. 2015). Este sistema se ha observado en especies de Opiliones en las cuales el dimorfismo sexual es poco marcado, las hembras oviponen en lugares que no pueden ser monopolizados por los machos y los machos ofrecen regalos nupciales en forma de secreciones glandulares durante la cópula (Machado & Macías-Ordóñez 2007; Buzatto & Machado 2014). Para el suborden Laniatores y algunas especies del clado Eupnoi, el sistema de apareamiento más común es la poliginia por defensa de recursos, donde los machos defienden recursos y ganan acceso a varias hembras atraídas por éstos (Machado et al. 2015). Este tipo de sistema se ha descrito en especies que presentan un dimorfismo sexual marcado y en las que los machos pelean entre sí por territorios que posteriormente serán visitados por las hembras que buscan sitios para oviponer (Buzatto & Machado 2008, 2014).

Dentro del suborden Laniatores, la familia Gonyleptidae es la más diversa, con cerca de 830 especies (Kury 2015), y ha sido particularmente estudiada en cuanto a la biología reproductiva de varias especies (Buzatto et al. 2013). Los estudios en esta familia se han enfocado principalmente en su ecología reproductiva y, entre las especies con cuidado paternal, en el efecto del cuidado

sobre el éxito reproductivo de los machos (Machado et al. 2004; Buzatto & Machado 2008; Nazareth & Machado 2010; Zatz et al. 2011; Requena & Machado 2015). Se encontró que dentro de la familia existen tanto especies sin ningún tipo de cuidado post-oviposición, como también especies que presentan cuidado maternal o paternal (Machado & Macías-Ordóñez 2007; Buzatto et al. 2013; Machado et al. 2016).

El comportamiento sexual en Opiliones en general se divide en tres etapas: (1) pre-copulatoria: desde el inicio del cortejo hasta la inserción del pene, (2) copulatoria: desde la inserción hasta la retracción del pene, y (3) post-copulatoria: desde la retracción hasta la separación definitiva de la pareja (Fig. 2). La hembra puede resistir y rechazar al macho en cualquiera de las tres etapas (Machado et al. 2015). El cortejo pre-copulatorio realizado por el macho es corto y táctil, pero una vez que se da la inserción del pene, hay un conspicuo cortejo copulatorio que consiste en toques y/o roces con el primer y segundo par de patas del macho en patas o dorso de la hembra (Machado & Macías-Ordóñez 2007; Nazareth & Machado 2009; Fowler-Finn et al. 2014; Requena & Machado 2014; Machado et al. 2015; Stanley et al. 2016). El extremo del pene es muy ornamentado y los espermatozoides carecen de flagelo o cualquier estructura que promueva movilidad para los gametos masculinos (Morrow 2004; Macías-Ordóñez et al. 2010). En base a estas características se ha planteado que la competencia espermática y la elección críptica femenina podrían ser las principales fuerzas evolutivas conduciendo las estrategias sexuales de Opiliones (Macías-Ordóñez et al. 2010).

En varios estudios donde se describe con más detalle la cópula en diferentes especies de opiliones, se plantea que los comportamientos realizados por el macho durante la etapa copulatoria y post-copulatoria (entrega de sustancias producidas por el macho, toques intensos y repetitivos con patas I en dorso y patas de la hembra, guardia post-copulatoria) podrían potencialmente estimular la oviposición y posiblemente ser utilizados por la hembra para sesgar la paternidad (Nazareth & Machado 2009; Fowler-Finn et al. 2014; Requena & Machado 2014). Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios que hayan investigado la elección crítica femenina en especies del orden. Asimismo, estudios en los que se haya cuantificado la transferencia espermática y su relación con características comportamentales masculinas y femeninas observadas durante la cópula son inexistentes para el orden como un todo.

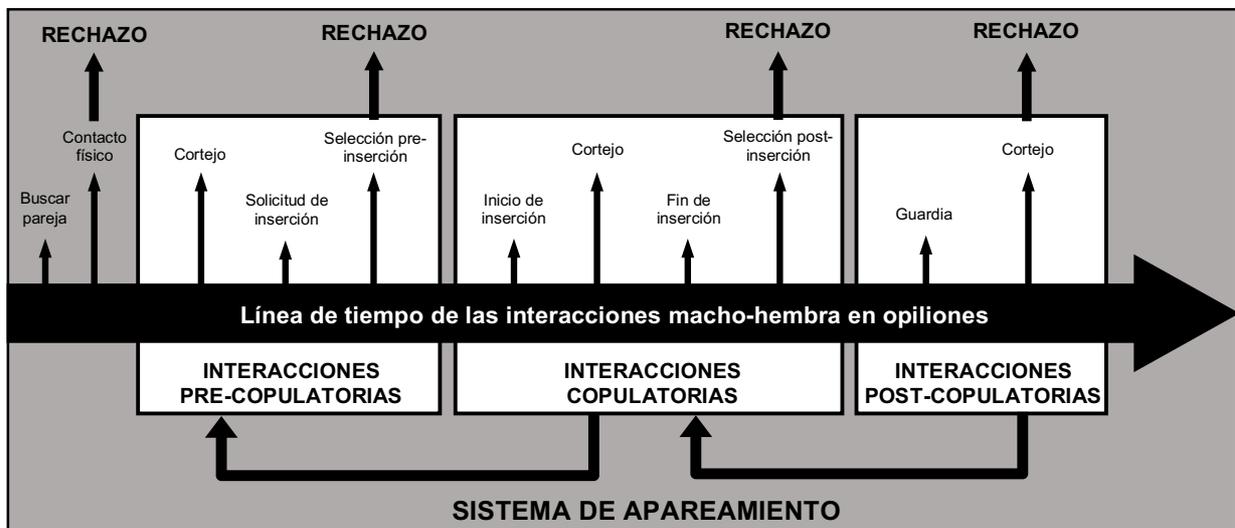


Figura 2. Esquema del orden cronológico de los eventos que ocurren durante las interacciones macho-hembra en Opiliones. El sistema de apareamiento (área gris) fija las reglas específicas sobre cómo y cuál sexo lleva adelante los comportamientos reproductivos. El comportamiento sexual se puede dividir en tres etapas (cajas blancas): (1) pre-copulatoria, (2) copulatoria y (3) post-copulatoria. El rechazo a la pareja puede ocurrir en diferentes momentos. La flecha negra que conecta las interacciones copulatorias con las pre-copulatorias representa las múltiples inserciones observadas en Eupnoi, mientras que la flecha negra que conecta las interacciones post-copulatorias con las copulatorias representa las recópulas observadas durante la guardia post-copulatoria registrada en Laniatores. Imagen modificada de Machado et al. (2015).

Pachyloides thorellii (Holmberg 1878) es una especie de Gonyleptidae presente en Uruguay y Argentina (Kury 2003). Los individuos poseen hábitos criptozoicos, crepusculares y solitarios, con marcado grado de sinantropía (Toscano-Gadea & Simó 2004). Tanto machos como hembras son de tamaño similar y, a diferencia de lo observado para la gran mayoría de las especies de Gonyleptidae, carecen de dimorfismo sexual notorio (Giuliani 2008; Fig. 3). La biología reproductiva de la especie se ha estudiado básicamente en laboratorio (Stanley 2012), donde se generó un protocolo de cría a partir del cual se obtuvieron exitosamente varias generaciones de hembras y machos vírgenes.

Si bien carecen de armamento conspicuo, los machos utilizan las espinas de las coxas de sus patas IV en enfrentamientos intrasexuales. En otras especies de Gonyleptidae se observan comportamientos similares durante las luchas por territorios (Willemart et al. 2008; Zatz et al. 2011). Sin embargo, hasta el momento, no se ha logrado determinar con exactitud qué desencadena la pele entre machos en *P. thorellii* ni cuál es el macho ganador (Stanley 2012). Los enfrentamientos se desarrollan de manera ritualizada, ningún macho resulta herido durante las mismas, y se observan enfrentamientos tanto en presencia como en ausencia de hembras (Stanley obs pers). Al igual que la mayoría de los miembros del orden Opiliones, *P. thorellii* es una especie poliginándrica (Machado et al. 2015). Si bien en el campo se los encuentra durante los meses cálidos (noviembre a abril), en laboratorio pueden reproducirse durante todo el año (Stanley 2012). Las hembras oviponen aproximadamente un mes después de la cópula y no presentan cuidado parental (Stanley 2011). Las cópulas presentan un intenso cortejo copulatorio táctil por parte de los machos, que consiste en toques con el primer par de patas sobre las patas y el dorso de la

hembra. Las hembras son capaces de resistir y/o rechazar machos, y pueden finalizar la cópula abruptamente (Stanley et al. 2016). Sin embargo, hasta el momento ningún estudio ha evaluado si existe una relación causal entre los comportamiento de cortejo táctil del macho y los comportamientos femeninos mencionados anteriormente.



Figura 3. Vista dorsal de una hembra y un macho del opilión *Pachyloides thorellii*. Nótese que tanto el macho como la hembra tienen una apófisis en la coxa del cuarto par de patas. Barra de referencia: 1 mm.

Esta tesis profundiza sobre la descripción del cortejo y de cópula en *P. thorellii*, además de abordar e integrar aspectos hasta ahora escasamente estudiados del orden Opiliones, tales como el efecto del cortejo copulatorio táctil de los machos sobre la elección femenina y la transferencia espermática. Se propone un diseño experimental en el que se evalúa no sólo el efecto de alteraciones en la capacidad de realizar el estímulo por parte del macho, sino también en la percepción de estos estímulos por parte de la hembra. Además, se busca establecer una relación entre características del cortejo copulatorio táctil del macho y la transferencia espermática, utilizando por primera vez en Opiliones técnicas de extracción y conteo de espermatozoides.

Se presenta un modelo para estudios de selección sexual con gran

potencial debido a la facilidad de observar cópulas y la posibilidad de obtener individuos vírgenes. Además, *P. thorellii* es una especie que, a diferencia de la mayoría de las otras especies de la familia Gonyleptidae hasta ahora estudiadas, es solitaria, carece de cuidado parental y no presenta el dimorfismo sexual conspicuo y característico de otras especies del Infraorden Grassatores. Por lo tanto, la especie en sí misma toma un valor importante para hacer estudios comparativos e investigar las causas de estas diferencias y determinar si obedecen a diferencias en las condiciones ecológicas que modelan la biología reproductiva de la especie.

Objetivo general

Determinar la importancia del cortejo pre-copulatorio y copulatorio en el éxito de cópula y la transferencia espermática en el opilión *Pachyloides thorellii*.

Objetivos específicos e hipótesis

1) Realizar una descripción detallada del comportamiento copulatorio de *P. thorellii*. Existen comportamientos que sugieren la presencia de cortejo táctil masculino durante la cópula y de selectividad por parte de la hembra (Stanley et al. 2016). Por lo tanto, la hipótesis general es que existe una relación entre los comportamientos realizados por el macho y una determinada respuesta (rechazo o aceptación) por parte de la hembra durante la cópula.

2) Determinar la influencia de la limitación del cortejo táctil (tanto pre-copulatorio como copulatorio) masculino en: (a) la aceptación de cópula y su duración, (b) la tasa de aceptación de segundos apareamientos y (c) la cantidad de espermatozoides presentes en los receptáculos seminales femeninos. La

hipótesis es que el cortejo táctil masculino aumenta el éxito de cópula. La predicción es que hembras que se enfrenten con machos cuyo cortejo se vea reducido y hembras cuya capacidad de percibir el cortejo se limite experimentalmente, tendrán: (a) menor tasa de aceptación de cópula, (b) menor duración de apareamientos y (c) menor cantidad de espermatozoides en los receptáculos seminales femeninos, que entre machos y hembras sin limitación.

3) Determinar la asociación entre la intensidad y duración del cortejo táctil masculino (pre-copulatorio y copulatorio) y la transferencia espermática. La hipótesis es que cortejos más intensos y cópulas más prolongadas permiten una mayor transferencia de esperma. La predicción es que las hembras que copulen con machos que realizan mayor frecuencia de toques con patas I tendrán cópulas más largas y mayor cantidad de espermatozoides en sus receptáculos seminales.

CAPÍTULO 1

Dialogando, ¿se llega al éxito?: Interacción macho-hembra durante la cópula en *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae)

Introducción

En la mayoría de las especies animales, las interacciones entre macho y hembra durante el comportamiento sexual pasan por diferentes etapas: pre-cópula, cópula y post-cópula (Andersson 1994). Fuerzas selectivas, incluyendo conflicto intersexual, selección epigámica, competencia espermática y elección críptica femenina, actúan en cada etapa moldeando los rasgos involucrados (Andersson & Simmons 2006). Por lo tanto, tener una descripción detallada de las interacciones macho-hembra observadas durante las diferentes etapas del apareamiento es el primer paso para entender como la selección sexual actúa sobre la morfología y los comportamientos sexuales.

Stanley et al. (2016) describieron y cuantificaron el comportamiento sexual del opilión *Pachyloides thorellii* (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae). Encontraron que la secuencia de comportamientos se desarrolla en las etapas planteadas por Machado et al. (2015): pre-copulatoria, copulatoria y post-copulatoria. La etapa pre-copulatoria se inicia con toques de las patas I y II del macho sobre el dorso de la hembra. Ante el acercamiento del macho, la hembra puede rechazarlo ya sea alejándose del lugar, retrayendo sus patas delanteras y pedipalpos y/o presionando la parte anterior del cuerpo contra el sustrato (Stanley et al. 2016). Si no es rechazado, el macho sujeta a la hembra con sus pedipalpos y la pareja adopta la posición típica de cópula en Laniatores, o sea,

frente a frente sujetos por los pedipalpos y quelíceros, apoyándose en sus patas traseras y elevando la parte delantera del cuerpo formando un ángulo de 90° entre la región anterior de los cuerpos de macho y hembra. En esa posición, el macho evierte el pene y lo introduce en el opérculo genital de la hembra mientras continúa los toques con las patas I en el dorso de la hembra, iniciando la etapa copulatoria. La hembra generalmente se mantiene quieta en posición de cópula moviendo lentamente sus patas II. A lo largo de la cópula, la hembra puede tirar hacia atrás de la sujeción o bajar levemente la parte delantera del cuerpo, comportamientos que pueden llevar a la finalización de la cópula. El fin de la cópula se da cuando el macho retira el pene, la sujeción termina y los individuos se separan. Durante la etapa post-copulatoria, el macho puede permanecer cerca de la hembra durante unos minutos, tocándola nuevamente con las patas I y II mientras ésta limpia sus patas y el opérculo genital (Stanley et al. 2016).

Determinar de qué manera y en qué momento se da la inserción y retracción del pene durante la cópula en *P. thorellii* es importante para analizar si existe una relación causal entre el cortejo del macho, los rechazos femeninos y la transferencia de esperma. A partir de observaciones detalladas de cópulas, se detectaron una serie de comportamientos no descriptos ni cuantificados por Stanley et al. (2016) y que pueden aportar más información sobre las estrategias de elección por parte de la hembra y de estimulación por parte del macho durante la cópula. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es realizar una descripción detallada del comportamiento copulatorio de *P. thorellii* para determinar si existe una relación causal entre los comportamientos masculinos y los femeninos observados durante la cópula en esta especie. La hipótesis a poner a prueba es que existen comportamientos de cortejo masculino vinculados con una

determinada respuesta (rechazo o aceptación) por parte de la hembra en *P. thorelli*. Esperamos observar, por lo tanto, una relación positiva entre la presencia de los comportamientos de cortejo realizados por el macho y una respuesta de aceptación y continuación de la cópula por parte de la hembra.

Metodología

Cría y mantenimiento de ejemplares

Los ejemplares de *P. thorellii* fueron criados y mantenidos en el Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay. La cría de esta especie se inició en el año 2008 a partir de individuos adultos de ambos sexos colectados en el balneario Marindia (34°46'S; 55°49'W), Departamento de Canelones, Uruguay. Desde ese año se han realizado cópulas controladas entre individuos nacidos en el laboratorio y con ejemplares traídos de Marindia (para no reducir la diversidad genética), y se han obtenido de forma exitosa adultos vírgenes de *P. thorellii*. Los individuos utilizados en este trabajo son adultos vírgenes nacidos en el laboratorio de entre uno y seis meses de edad adulta.

Las ninfas fueron mantenidas en el recipiente materno hasta que alcanzaron el estadio subadulto (aproximadamente 2 meses luego de la eclosión). En dicho estadio, las ninfas adquieren un aspecto muy similar al adulto en forma y coloración, tornándose opacas pero con un tamaño menor (promedio \pm DS = 5,0 \pm 1,0 mm de largo del escudo dorsal). La separación de los individuos no se realizó inmediatamente luego de la eclosión debido a que durante las primeras semanas de vida las ninfas de Opiliones son sumamente sensibles a cambios de temperatura y particularmente de humedad (Santos 2007). Por lo

tanto, el traslado a un nuevo recipiente podría modificar las condiciones ambientales de manera muy drástica (E. Stanley obs. pers.).

Una vez alcanzado el estadio subadulto, los individuos fueron aislados y mantenidos individualmente en recipientes herméticos de plástico con 10 cm de diámetro y 8 cm de altura. En cada recipiente, había arena como sustrato, trozos de troncos o piedras como refugios, y un algodón embebido en agua para mantener la humedad. Se llevó un control semanal del crecimiento de los subadultos para determinar el momento en que alcanzaban la adultez. En *P. thorellii* se puede diferenciar machos de hembras observando ventralmente la zona del opérculo genital (Fig. 4). Los machos tienen la parte distal del área estigmática fina y larga y su contorno se encuentra rodeado por un surco tegumentar que a la luz se observa como una línea más clara (Fig. 4A). A las hembras se les transparenta el extremo del ovipositor y tienen la parte distal del área estigmática ancha y corta (Fig. 4B).

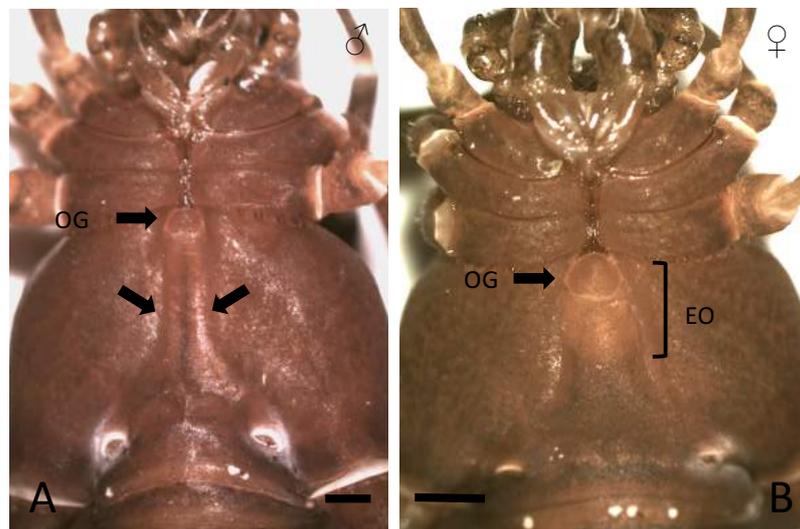


Figura 4. Diferenciación entre machos y hembras de *Pachyloides thorellii*. (A) El macho presenta la parte distal del área estigmática larga y fina y se observa su contorno más claro (flechas negras). (B) En la hembra, la parte distal del área estigmática ancha y corta, y se transparenta el extremo del ovipositor (EO). (OG) Opérculo genital. Barras de referencia: 1 mm.

A lo largo de todo el desarrollo post-embionario, los individuos de *P. thorellii* fueron alimentados con trozos de *Zophobas morio* y *Tenebrio molitor* (Coleoptera), pepino, manzana y alimento para gatos (FirstClass®). El algodón húmedo fue cambiado una vez por semana para evitar el crecimiento de hongos. La temperatura promedio (\pm DS) en laboratorio durante el período de cría fue de $22,7 \pm 3,1$ °C en 2015 y $22,5 \pm 3,3$ °C en 2016.

Observaciones comportamentales

Se enfrentaron machos y hembras vírgenes durante abril-mayo de 2015 y mayo-junio de 2016 a una temperatura promedio (\pm DS) de $21,6 \pm 1,7$ °C. Las hembras fueron colocadas de 24 a 48 h antes de cada experiencia en terrarios cuadrados de vidrio (15 x 15 cm de base, 4 cm de altura) con arena como sustrato, un trozo de tronco como refugio y un algodón humedecido en agua para mantener la humedad. Los machos fueron colocados sobre la arena en el lado opuesto al que se encontraba la hembra, inmediatamente antes de comenzar cada observación. Una vez iniciada la experiencia, se esperaron 15 min; de no observarse cortejo por parte del macho, la experiencia era detenida y se esperaban 24 h para reintentarla con el mismo macho. De observarse cortejo, las experiencias tenían una duración de 30 min o hasta que finalizara la cópula.

Las observaciones comportamentales se llevaron a cabo bajo luz roja, ya que la mayoría de los artrópodos son relativamente ciegos a ella (Greenfield 2002). Los terrarios fueron colocados sobre una base de espuma de poliuretano apoyada sobre un taburete giratorio (Fig. 5). Todas las experiencias fueron filmadas con una cámara SONY DCR-SR87 fija en un trípode a la misma altura que el terrario (Fig. 5). Machos y hembras fueron pesados y medidos (largo y

ancho del escudo dorsal siguiendo a Willemart et al. 2008). Las hembras fueron medidas (peso y dimensiones corporales) antes de colocarlas en el terrario y los machos luego de cada observación. El pesado se realizó con una balanza digital Sartorius (peso máximo = 210 g; precisión = 0,1 mg) y las mediciones se realizaron bajo lupa estereoscópica OLYMPUS SZ-61.

Todas las observaciones fueron analizadas para determinar la frecuencia y duración de los comportamientos masculinos y femeninos. Se consideró que la etapa pre-copulatoria se inicia cuando el macho realiza la unidad "Toque con pata I y II" y finaliza cuando se da la inserción del pene en el opérculo genital femenino (unidad "Inserción del pene"). Aquí inicia la etapa copulatoria (cópula) que finaliza con la retracción del pene (unidad "Retracción"). A partir de este comportamiento (retracción del pene) y hasta la unidad "Separación total" se consideró que ocurre la etapa post-copulatoria. La duración de los comportamientos "protruye boca" y "abre opérculo genital" refieren al período entre que la hembra realiza dichos comportamientos y ocurre la inserción. La hembra mantiene la boca proyectada hacia afuera y el opérculo genital abierto durante toda la cópula.

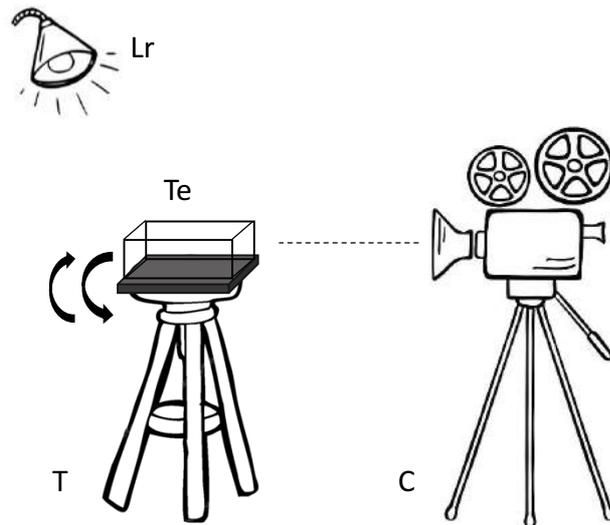


Figura 5. Representación esquemática de cómo fueron conducidas las filmaciones en laboratorio. La luz roja (Lr) se ubicó aproximadamente a 50 cm del terrario (Te). El terrario se colocó sobre una base de espuma de poliuretano (en gris) y sobre un taburete (T), cuyas direcciones de giro se muestran con las flechas negras. La cámara filmadora (C) se ubicó a la altura del terrario (línea punteada).

Análisis estadístico

Se cuantificó la frecuencia y duración de cada comportamiento observado tanto para machos como para hembras y se realizaron tres diagramas de flujo, uno para cada etapa (i.e., pre-copulatoria, copulatoria y post-copulatoria), con el fin de complementar y profundizar el diagrama propuesto por Stanley et al. (2016). Se llevó a cabo un análisis de cadenas de Markov de primer orden para establecer si existe una relación no azarosa entre la secuencia de comportamientos observados. Para determinar si las transiciones entre comportamientos masculinos y femeninos y viceversa difieren en su frecuencia de lo esperado por azar, se utilizaron los valores de frecuencias observadas y esperadas de cada transición obtenidos del análisis de cadenas de Markov para realizar tests de χ^2 . Los análisis fueron realizados con el programa PAST 3.0 (Hammer et al. 2003).

Resultados

De 80 encuentros sexuales realizados, en 21 se observó cópula entre individuos de *P. thorellii*. La duración total promedio \pm Desvío standard (DS) fue de $764,2 \pm 339,8$ s (rango = 103 - 1340 s). Se lograron identificar y cuantificar once comportamientos nuevos y se modificó la definición de algunos comportamientos ya reportados por Stanley et al. (2016) (Fig. 6; Tabla 1).

La etapa pre-copulatoria (Fig. 7A) tuvo una duración promedio de 48,7 s (DS = 43,3; rango = 17 - 210 s). Esta etapa se inicia cuando el macho corteja a la hembra tocándola con sus patas I y II en el dorso y patas. Si la hembra no se aleja, el macho continúa el cortejo mientras se ubica en la posición copulatoria. Se observó que cuando el macho se está ubicando para sujetar a la hembra (unidad comportamental “macho sobre hembra”) la hembra usualmente protruye la boca ($X^2 = 31,35$; $p < 0,001$; Fig. 8A). Luego, durante la sujeción (cuando el macho se coloca frente a frente con la hembra y mueve pedipalpos y quelíceros hasta sujetarse firmemente y elevar la parte frontal de ambos), la hembra usualmente abre el opérculo ($X^2 = 6,63$; $p = 0,010$; Fig. 8A), lo cual lleva a la inserción ($X^2 = 112,89$; $p < 0,001$). En un caso en el que se observó un macho con inconvenientes para insertar (“Inserción fallida”), la hembra además evertió el ovipositor ($X^2 = 66,27$; $p < 0,001$; Fig. 8C) hasta que el macho logró dirigir el pene y realizar la inserción.

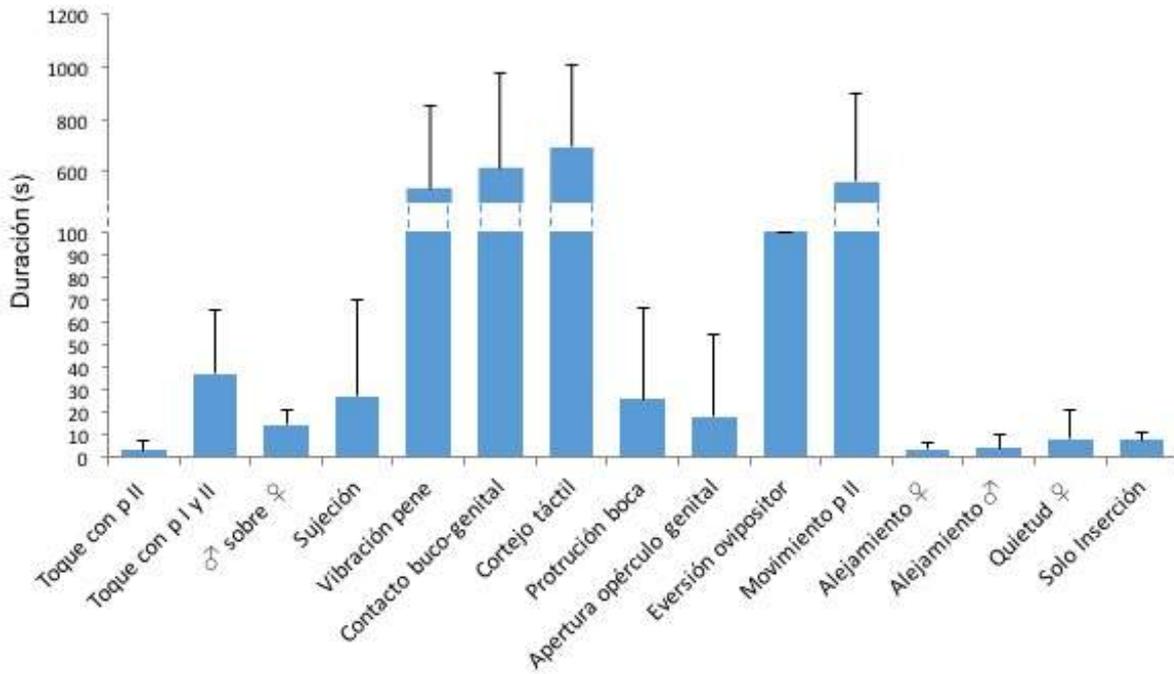


Figura 6. Duración promedio (\pm DS) de cada comportamiento observado durante el comportamiento sexual del opilión *Pachyloides thorellii*. Para la descripción de cada conducta ver Tabla 1.

Tabla 1. Definición de comportamientos nuevos, modificados y mantenidos de Stanley et al. (2016) observados durante el comportamiento sexual del opilión *Pachyoides thorellii*. Luego de la definición del comportamiento se señala, entre paréntesis, la etapa/s en la que fue observado. (PreC) Etapa Pre-copulatoria; (C) Etapa Copulatoria y (PostC) Etapa Post-copulatoria.

Comportamiento	Definición	Fuente
Toque con pata II	Toques mutuos con el tarso de las patas II. Los individuos están quietos sobre el sustrato y tocan el dorso, costados y/o primeros tres pares de patas del otro individuo. (PreC)	Stanley et al. (2016)
Toque con pata I y II	El macho toca aceleradamente el dorso de la hembra con el tarso de las patas I, mientras al mismo tiempo, continúan los toques con las patas II. (PreC)	Stanley et al. (2016)
Acometida	El macho extiende sus pedipalpos y se impulsa hacia adelante con las patas IV para aproximarse rápidamente sobre la hembra. (PreC)	Stanley et al. (2016)
Macho sobre hembra	El macho sube sobre el dorso de la hembra y se va deslizando sobre éste hasta colocarse frente a ella. Mientras continua realizando la unidad "Toques con patas I y II" extiende sus pedipalpos y raspa el dorso de la hembra. (PreC)	Stanley et al. (2016)
Protrución de la boca	La hembra protruye su boca en dirección ventral (Fig. 8A). (PreC)	Nuevo
Apertura del opérculo genital	La hembra abre el opérculo genital (Fig. 8A). (PreC)	Nuevo
Eversión del ovipositor	Con el opérculo genital abierto, la hembra evierte su ovipositor (Fig. 8C). (PreC)	Nuevo
Sujeción	Ubicado frente a la hembra, el macho utiliza la uña de sus pedipalpos para sujetar la coxa del primer par de patas de la hembra y con sus quelíceros toma los quelíceros de la hembra. Simultáneamente realiza la unidad "Toques con patas I y II". (PreC)	Stanley et al. (2016)
Elevación	El macho se apoya en las patas IV para elevar la parte anterior de su cuerpo y la parte anterior del cuerpo de la hembra, con los dos individuos formando un ángulo de aproximadamente 90° entre sí. (PreC)	Stanley et al. (2016)
Corcoveo	La hembra lleva la parte posterior del cuerpo hacia arriba por medio de una extensión rápida de sus patas IV. (PreC)(C)	Nuevo
Intento de inserción	Manteniendo la sujeción, el macho evierte el pene en dirección al opérculo genital femenino y mueve la parte posterior del cuerpo de manera pendular. Primero, llevando el abdomen hacia arriba y atrás y luego empujando hacia abajo y adelante, pasando el extremo del pene por la zona ventral de la hembra. Inmediatamente lo retrae al no lograr introducir el extremo distal del pene dentro del opérculo genital femenino (Fig. 8B). (PreC)	Nuevo

Inserción fallida	Idem "Intento de inserción" pero el macho dirige el pene en una dirección distinta al opérculo genital femenino. Por ejemplo, hacia arriba entre las patas (Fig. 8C). (PreC)	Nuevo
Inserción del pene	El macho introduce el extremo distal del pene en el opérculo genital femenino. (C)	Nuevo
Cortejo táctil	Con el pene inserto el macho apoya los tarsos de ambas patas I en el dorso del cuerpo de la hembra e inmediatamente los desliza hacia los costados del cuerpo de la hembra. Al mismo tiempo mantiene las patas II en el aire alternando entre una y otra pata para tocar suavemente los costados del cuerpo y patas de la hembra. (C)	Nombre modificado "Cortejo copulatorio" en Stanley et al. (2016)
Vibración del pene	El macho realiza movimientos hacia arriba y abajo con el pene luego de la inserción (Fig. 9A). (C)	Nuevo
Contacto buco-genital	El extremo distal de la vaina del pene entra en contacto con la boca de la hembra, la cual se encuentra protruida en dirección ventral (Fig. 9B). (C)	Nuevo
Movimiento de inserción	Manteniendo el extremo del pene introducido en el opérculo genital femenino, el macho realiza un movimiento pendular (ídem "Intento de inserción") llevando la parte posterior del cuerpo hacia arriba y atrás y luego empujando hacia abajo y adelante. (C)	Nuevo
Solo inserción	El macho solo mantiene la inserción pero sin realizar ningún otro comportamiento. (C)	Nuevo
Tirones	La hembra se apoya patas III y IV tirando hacia atrás. (PreC)(C)	Stanley et al. (2016)
Movimiento patas II	La hembra mueve lentamente las patas II. (C)	Stanley et al. (2016)
Baja cuerpo	La hembra flexiona las patas I, III y IV bajando el cuerpo. (PreC)(C)	Stanley et al. (2016)
Retracción	El macho retira el pene del opérculo genital femenino y lo retrae cerrando su opérculo genital sin que la pareja se suelte. (C)	Definición modificada de Stanley et al. (2016)
Separación	Se suelta la sujeción de pedipalpos y quelíceros y se separa la pareja. (PostC)	Definición modificada de Stanley et al. (2016)
Limpieza de opérculo	La hembra evierte el ovipositor hasta que el extremo distal entra en contacto con su boca, mientras raspa la vaina con las uñas de sus pedipalpos y luego se los lleva a la boca (Fig. 10). (PostC)	Definición modificada de Stanley et al. (2016)
Alejamiento	Un individuo camina distanciándose del otro. (PostC)	Stanley et al. (2016)
Quietud	El individuo permanece inmóvil luego de la separación. (PostC)	Stanley et al. (2016)
Separación total	Los miembros de la pareja se alejan a una distancia mayor al largo de sus patas II. (PostC)	Stanley et al. (2016)

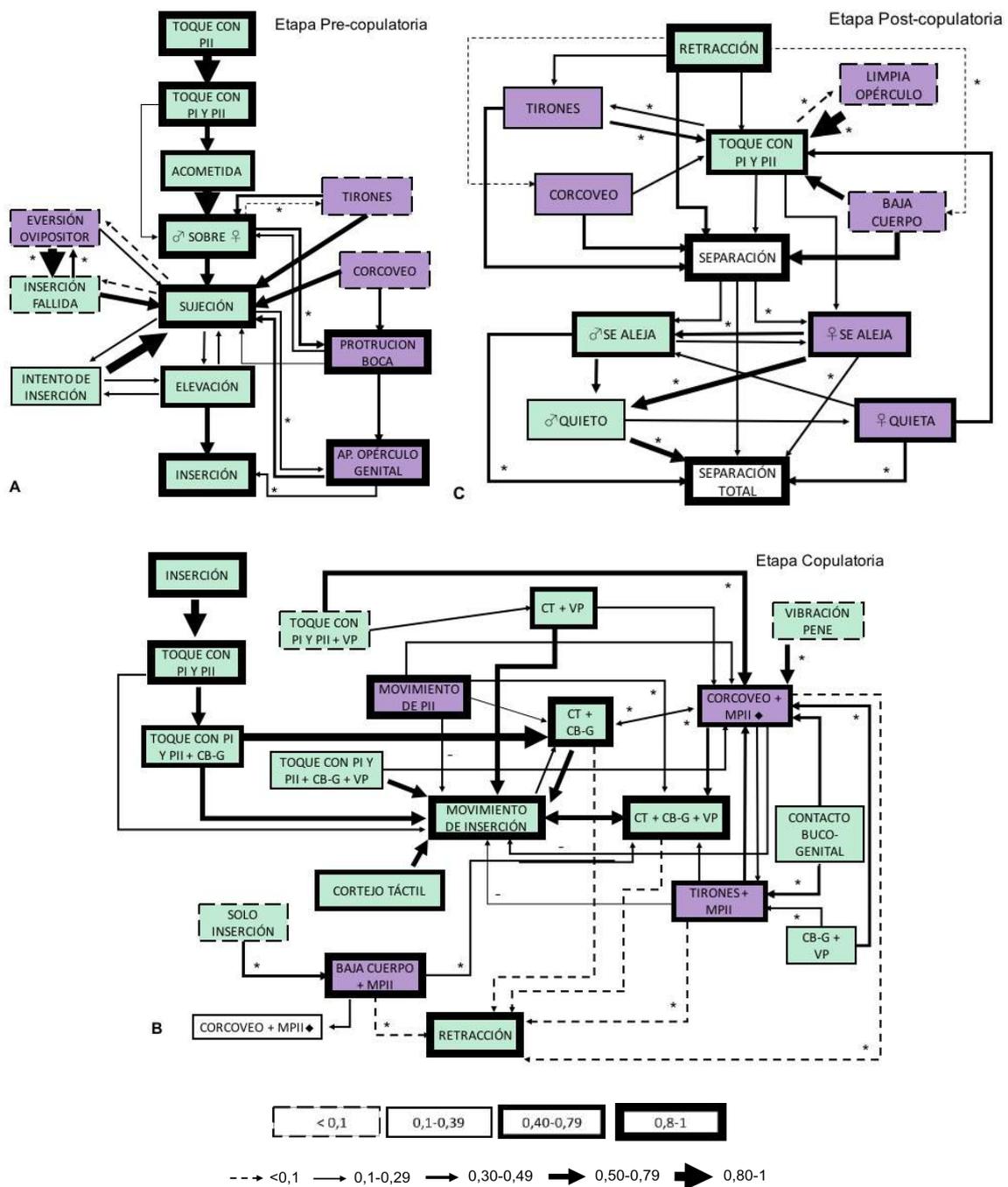


Figura 7. Diagramas de flujo de las tres etapas del comportamiento sexual en el opilión *Pachyloides thorellii*: (A) etapa pre-copulatoria; (B) etapa copulatoria; (C) etapa post-copulatoria. El grosor de las flechas indica la probabilidad de transición de una unidad comportamental a la siguiente. El grosor del contorno de cada unidad comportamental indica su frecuencia durante el apareamiento. Las cajas verdes representan comportamientos realizados por el macho, las cajas violetas, comportamientos realizados por la hembra y las cajas blancas, comportamientos realizados por ambos. Los asteriscos indican transiciones con frecuencia mayor a la esperada al azar. Los guiones (-) indican transiciones con frecuencia menor a la esperada al azar. El rombo (♦) indica que el comportamiento se repite en otro lado en el mismo diagrama (la separación de estos comportamientos es simplemente para facilitar la visualización del diagrama). Abreviaciones de comportamientos: (CT) cortejo táctil; (VP) vibración del pene; (CB-G) contacto buco-genital; (MPII) movimiento de patas II.

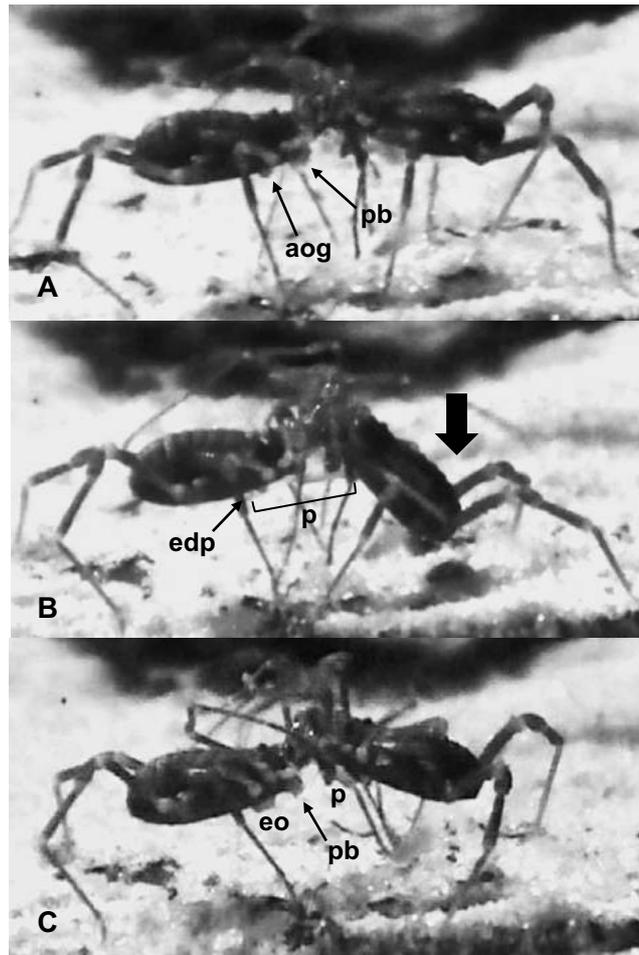


Figura 8. Comportamientos de macho (derecha) y hembra (izquierda) durante la etapa pre-copulatoria. (A) Posición frente-a-frente y sujeción. ♀ Protrusión de la boca (pb) y apertura del opérculo genital (aog). (B) Intento de inserción. ♀ mantiene protrusión de la boca y la apertura del opérculo genital; ♂ empuja su abdomen hacia abajo (flecha negra gruesa) mientras evierte el pene (p) en dirección al opérculo genital femenino. El intento no fue exitoso ya que se observa el extremo distal del pene (edp) por detrás del opérculo genital femenino. (C) Inserción fallida y eversión de ovipositor. ♀ mantiene protrusión de la boca y evierte ovipositor (eo); ♂ evierte el pene en una dirección distinta al opérculo genital femenino, en este caso, entre las patas de la hembra.

Una vez que el macho inserta el pene en el opérculo genital de la hembra, se inicia la etapa copulatoria (Fig. 7B) y con ésta la cópula, durante la cual ocurre la transferencia de esperma. Esta etapa es la que tiene la duración más larga de las tres etapas (promedio \pm DS = 704,3 \pm 342,9 s; rango = 58 - 1.300 s). El macho puede realizar tres comportamientos en simultáneo o en diferentes combinaciones durante esta etapa: (1) cortejo táctil, que implica toques con

patas I sobre el dorso y las patas de la hembra; (2) vibración del pene, que ocurre durante la inserción y consiste en su movimiento rápido hacia arriba y abajo (Fig. 9A); (3) contacto buco-genital, durante el cual el macho acerca la vaina del pene a la boca de la hembra mientras ella mantiene la protrusión de la boca (Fig. 9B). Este contacto de la boca con la vaina del pene (y en algunos casos con el tronco del mismo) se mantiene durante la mayor parte del tiempo de inserción. En algunos casos se llega a observar que la hembra mueve la boca cuando la vaina no está en contacto con ella.

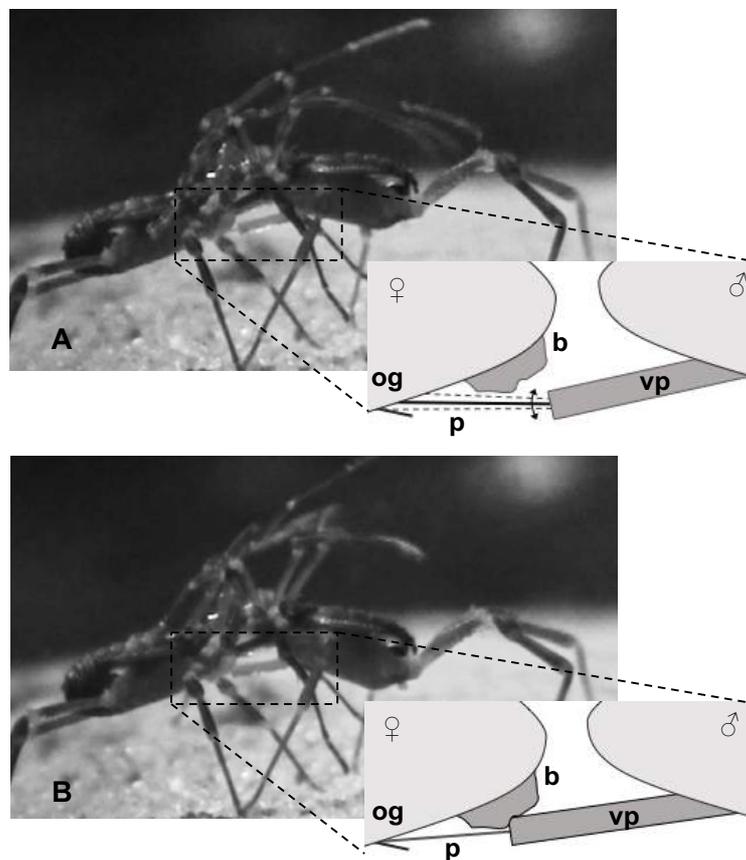


Figura 9. Nuevos comportamientos masculinos durante etapa copulatoria del opilión *Pachylodes thorellii*. (A) Vibración del pene: las líneas punteadas y las flechas indican el movimiento del pene. (B) Contacto buco-genital. En ambas fotos: (p) pene; (vp) vaina del pene; (b) boca; (og) opérculo genital.

Como se observa en el diagrama de flujo (Fig. 7B), si bien el macho puede realizar todas las combinaciones de los tres tipos de comportamientos descritos arriba durante la cópula, los más frecuentes son el cortejo táctil y el contacto buco-genital. Todas las combinaciones previamente descritas de unidades de cortejo durante la cópula llevan a un cuarto comportamiento realizado por el macho, el movimiento de inserción. Sin detener los comportamientos anteriores, el macho realiza periódicamente movimientos en los que retrae parcialmente el pene (sin retirar el extremo del opérculo femenino) e inmediatamente vuelve a introducirlo. Una vez que el macho inicia los movimientos de inserción generalmente los mantiene realizando cortejo táctil, vibración de pene y contacto de la vaina del pene con la boca en simultáneo. Los movimientos de inserción parecen ser periódicos (intervalos promedio \pm DS entre movimientos = $13 \pm 5,6$ s).

Durante la etapa copulatoria se observaron una serie de comportamientos femeninos (corcoveo, tirones, bajada de cuerpo y movimiento de patas II) que surgen en su mayoría cuando el macho detiene el cortejo táctil. Encontramos significativamente relacionadas las siguientes transiciones de comportamientos masculinos a comportamientos femeninos: (1) contacto buco-genital + vibración de pene seguidos por corcoveo ($X^2 = 20,66$; $p < 0,001$); (2) contacto buco-genital + vibración de pene seguidos por tirones ($X^2 = 21,36$; $p < 0,001$); (3) vibración de pene seguida por corcoveo ($X^2 = 37,07$; $p < 0,001$); (4) contacto buco-genital seguido por tirones ($X^2 = 8,38$; $p = 0,0038$); (5) sólo inserción seguida por bajada del cuerpo ($X^2 = 11,88$; $p < 0,001$). Dichos comportamientos femeninos desencadenan que el macho realice un cortejo más elaborado: (6) corcoveo seguido por cortejo táctil + contacto buco-genital ($X^2 = 82,92$; $p < 0,001$); (7)

bajada del cuerpo seguida por cortejo táctil + contacto buco-genital + vibración de pene ($X^2 = 12,25$; $p < 0,001$); (8) movimiento de patas II seguido por cortejo táctil + contacto buco-genital ($X^2 = 9,61$; $p = 0,0019$). Sin embargo, estos comportamientos femeninos no están asociados con movimientos de inserción. De hecho, la transición de estos comportamientos a los movimientos de inserción del macho fueron significativamente menores a lo esperado por azar (corcoveo: $X^2 = 125,52$; $p < 0,001$; tirones $X^2 = 56,39$; $p < 0,001$; movimiento pII: $X^2 = 7,97$; $p = 0,005$).

Se encontró que todos los comportamientos realizados por la hembra están asociados con la retracción definitiva del pene y por ende el final de la transferencia de esperma (Fig. 7B). Sin embargo, sólo el corcoveo ($X^2 = 52,42$; $p < 0,001$), los tirones ($X^2 = 1427,5$; $p < 0,001$) y la bajada del cuerpo ($X^2 = 38,03$; $p < 0,001$) mostraron frecuencias significativamente mayores a las esperadas por azar. Encontramos que en el 81% (N=17) de las cópulas la retracción del pene fue precedida de un comportamiento femenino.

La retracción del pene por parte del macho marca el comienzo de la etapa post-copulatoria (Fig. 7C), que tuvo una duración promedio (\pm DS) de $11,3 \pm 15,2$ s (rango = 1 - 70 s; Fig. 6). Luego de la retracción del pene, la sujeción de la pareja se mantuvo en promedio (\pm DS) durante $2,71 \pm 2,1$ s (rango = 1 - 7 s) y los toques con las patas I y II del macho continúan durante ese período. Se observó que luego de la retracción del pene, la hembra puede realizar tirones, corcoveos o bajadas del cuerpo y todos llevan a la separación de la pareja (Fig. 7C). Sin embargo, la frecuencia de transición entre cualquiera de los comportamientos femeninos mencionados y la retracción del pene no es significativamente mayor a la esperada por azar. Se detectó que cuando la

hembra realiza tirones, el macho responde con toques con las patas I y II y viceversa (tirones - toques con las patas I y II: $X^2 = 4,83$; $p = 0,028$; toques con las patas I y II – tirones: $X^2 = 4,55$; $p = 0,033$). También se observó que los toques con las patas I y II pueden continuar luego de la separación y que durante este período la hembra puede evertir el ovipositor y limpiarlo pasando sus pedipalpos desde la base hasta el extremo ($X^2 = 4,83$; $p = 0,028$; Fig. 10). Sólo se observó un caso en el que la hembra se limpiaba el opérculo antes de la separación total. Sin embargo, cabe mencionar que la limpieza del ovipositor ocurrió, al menos una vez, en el 76% de los casos (N=16), si bien en la mayor parte de las ocasiones (N=15) se dio luego de la separación total de la pareja. El comportamiento tuvo una duración promedio (\pm DS) de $41,2 \pm 37,3$ s (rango = 10 - 145 s) y en la tercera parte de estos casos (31%) la hembra lo realizó en más de una oportunidad (máximo = 3).

La separación total y el fin de la etapa post-copulatoria se dio cuando uno o ambos miembros de la pareja se alejaron a una distancia mayor que el alcance de su segundo par de patas. Luego de la separación, generalmente la hembra se alejó ($X^2 = 6,17$; $p = 0,013$) — lo cual pudo llevar a que el macho también se alejara ($X^2 = 12,47$; $p < 0,001$) o permaneciera quieto en el lugar ($X^2 = 155,27$; $p < 0,001$). El alejamiento de cualquiera de los individuos así como la quietud del macho llevaron a la separación total de la pareja (hembra se aleja - separación total: $X^2 = 12,24$; $p < 0,001$; macho se aleja - separación total: $X^2 = 218,98$; $p < 0,001$; quietud del macho - separación total: $X^2 = 47,24$; $p < 0,001$).

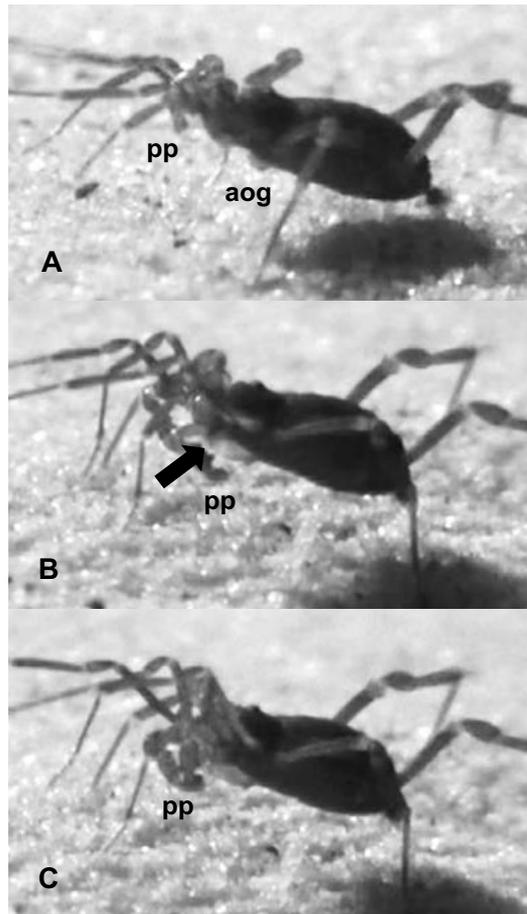


Figura 10. Limpieza de opérculo por una hembra del opilión *Pachyloides thorelli*. (A) La hembra abre el opérculo genital (aog), (B) En seguida, evierte el ovipositor hasta alcanzar la boca (flecha negra) y lleva los pedipalpos (pp) a la base del mismo. (C) Finalmente, pasa los pedipalpos por el tronco del ovipositor hasta llegar al extremo distal.

Discusión

En este estudio se encontró que durante la etapa pre-copulatoria, en respuesta al cortejo del macho, la hembra de *P. thorelli* puede rechazar al macho o protruir la boca y posteriormente abrir el opérculo genital. Estos comportamientos pueden estar mostrando el grado de receptividad femenina, dado que la protrusión de la boca se dio, en general, antes de la apertura de su opérculo genital. La protrusión de la boca puede implicar que la hembra se prepara para probar algo. En el caso de *P. thorelli*, podría implicar la obtención de sustancias desde el pene y/o presentes nupciales en la vaina. Este

comportamiento femenino se inicia antes de la cópula y se mantiene durante toda la transferencia espermática. Podría tratarse de una forma por la cual la hembra evalúa la calidad del macho y/o que el macho utiliza para prolongar la cópula (Eberhard 1996). El pasaje de sustancias de machos a hembras antes y durante la cópula se ha reportado para otras especies de opiliones pertenecientes al suborden Palpatores (revisión en Machado et al. 2015). En el clado Eupnoi, los machos de algunas especies del género *Leiobunum* (Sclerosomatidae) presentan sacos con glándulas accesorias alrededor del pene que producen sustancias de las que la hembra se alimenta antes de aceptar o rechazar la cópula (Macías-Ordóñez et al. 2010; Burns et al. 2012, 2013; Fowler-Finn et al. 2014). En el clado Dyspnoi, machos de una especie de *Paranemastoma* (Nemastomatidae) y dos especies de *Ischyropsalis* (Ischyropsalididae) proporcionan sustancias que provienen de un par de glándulas alojadas en la base de sus quelíceros. En estos dos géneros, los machos ofrecen o de alguna manera fuerzan sus quelíceros en la boca de la hembra antes de la inserción (Martens 1969; Meijer 1972). El presente estudio es el primer caso reportado de contacto buco-genital para *P. thorellii* y para una especie del suborden Laniatores. Futuros estudios analizarán el aparato genital masculino en *P. thorellii* en busca de glándulas accesorias u otras estructuras desde las cuales las hembras pudieran obtener alguna sustancia antes y/o durante la inserción.

En Opiliones, la cópula no puede llevarse a cabo si el opérculo genital femenino está cerrado (Macías-Ordóñez et al. 2010; Machado et al. 2015). Se observó que las hembras de *P. thorellii* abren su opérculo voluntariamente segundos antes de que ocurra la inserción. No se han reportado hasta el

momento casos en los que los machos abran o intenten abrir el opérculo genital femenino a la fuerza (vea Burns et al. 2013 para una discusión biomecánica). Eso indica que el cortejo es la herramienta con la que cuentan los machos para que las hembras permitan la inserción. Stanley et al. (2016) encontraron que la sujeción de la pareja se da a través de dos elementos: (1) sujeción con pedipalpos, cuando el macho sujeta la base del primer par de patas de la hembra con sus pedipalpos, y (2) sujeción con quelíceros, cuando ambos miembros de la pareja se sujetan los quelíceros mutuamente. Durante este estudio, se observó en un caso a la hembra desplegar el ovipositor cuando el macho no logró dirigir el pene en la dirección correcta (ver “Inserción fallida” en Tabla 1). Por último se observó que los pedipalpos de la hembra están hacia abajo antes y durante la cópula y que durante los intentos de inserción el macho desliza el pene por entre los pedipalpos, lo pasa por la boca de la hembra y sigue la línea intercoxal media en la parte ventral de la hembra que termina en el opérculo genital. De acuerdo con esto, tal vez todos estos elementos y comportamientos femeninos estén guiando al pene del macho hacia el opérculo genital femenino.

Luego de la inserción, se inicia la etapa copulatoria, en la que se observó que el cortejo del macho es mucho más complejo de lo descrito inicialmente por Stanley et al. (2016). Se encontró que existen al menos dos comportamientos adicionales al cortejo táctil ya descrito, que podrían estar implicados en la elección femenina. Ambos comportamientos parecen no estar asociados con la inseminación propiamente dicha y podrían ser estimulatorios. Uno de éstos es el contacto de la vaina del pene con la boca de la hembra. Como se mencionó anteriormente, el macho podría estar transfiriendo a la hembra sustancias nutritivas que ayuden a prolongar la duración de la cópula y por tanto aumentar

su éxito reproductivo. Alternativamente, es posible que ese contacto sea necesario para que la hembra evalúe al macho y determine el destino del esperma recibido durante la cópula (Eberhard 1996, 2010; Machado et al. 2015). Otro de los comportamientos es la vibración del pene durante la inserción. Este es el primer reporte de dicho comportamiento entre los Laniatores, ya que hasta el momento se había observado que en este suborden, una vez realizada la inserción, el macho se mantenía inmóvil hasta finalizar la cópula (Machado et al. 2015). Estos movimientos, junto con los flagelos, espinas y apófisis que Stanley et al. (2016) describieron en la parte distal del pene, podrían estar asociados con la existencia de estimulación genital masculina durante la cópula en *P. thorellii*.

Wulff et al. (2015) encontraron que los machos del grillo *Metrioptera roeselii* (Gryllidae) presentan una serie de apéndices genitales llamados “titiladores” con los que cortejan genitualmente a las hembras con golpes en una zona dentro de la genitalia femenina que presenta receptores sensoriales. El ovipositor de Laniatores tiene una serie de sensilias que podrían ser estimuladas por las estructuras presentes en la parte distal del pene a través de movimientos de la genitalia masculina (Macías-Ordóñez et al. 2010). En el presente estudio, no sólo se observó la vibración del pene luego de la inserción sino que también se describen por primera vez una serie de movimientos corporales realizados por el macho que denominamos “movimientos de inserción”. Los machos, sin retirar el pene, mueven el abdomen de manera pendular hacia atrás y hacia adelante durante la cópula. En los Eupnoi, este tipo de conducta masculina está relacionada a la inserción del estilo en los receptáculos seminales femeninos (Macías-Ordóñez et al. 2010). Sin embargo, esta inserción no parece ser posible en los Laniatores, ya que el esperma es aparentemente depositado en el lumen

del ovipositor (Macías-Ordóñez et al. 2010). Por lo tanto, los movimientos genitales masculinos en Laniatores y Eupnoi posiblemente tengan funciones distintas. Debido a la forma de las estructuras descritas para la genitalia masculina de Laniatores, el lugar donde se deposita el esperma y el hecho de que las hembras pueden aparearse con varios machos antes de la oviposición, los movimientos de inserción podrían ayudar a transportar el esperma propio o a remover esperma previo similarmente a lo descrito en otras especies de arácnidos e insectos (ver ejemplos en, Eberhard 1996, 2011; Macías-Ordóñez et al. 2010; Machado et al. 2015; Briceño & Eberhard 2015). En este estudio, las hembras eran vírgenes por lo que la remoción de esperma previo no sería una opción. Sin embargo, para descartar esta posibilidad, es preciso cuantificar dichos movimientos en apareamientos con hembras copuladas para determinar si existen diferencias en el volumen final de esperma almacenado con respecto a los observados en hembras vírgenes.

Una alternativa para los movimientos de inserción es que se trate de los momentos de eyaculación. Los productos seminales en Laniatores son aparentemente impulsados a través del ducto espermático por medio de un órgano muscular ubicado en la base del pene (Macías-Ordóñez et al. 2010). Los movimientos de inserción podrían estar presionando la musculatura asociada al pene y la vesícula seminal, promoviendo la transferencia de esperma. Se observó además que, cuando la hembra realiza diferentes movimientos durante la inserción (tirones, bajada del cuerpo y corcoveo), el macho tiende a no realizar estos movimientos pero si a complejizar el cortejo adicionando otras unidades comportamentales. Es posible que con estos comportamientos la hembra esté señalizando la falta de cortejo y que, para obtener una transferencia exitosa y/o

aumentar su probabilidad de ser elegidos, los machos no transfieran esperma hasta que la hembra disminuya o cese los comportamientos de rechazo. De ser así, podríamos encontrarnos ante un caso de diálogo copulatorio, en el que los miembros de la pareja modifican sus comportamientos en función a lo realizado por el otro. De hecho, se espera que las interacciones recíprocas de este tipo sean mucho más probables durante la cópula que en etapas previas, ya que los miembros de la pareja están en contacto físico directo. Esto les permitiría detectar movimientos de la pareja y/o cambios comportamentales y fisiológicos mucho más sutiles, y responder a los mismos para obtener el mayor éxito del apareamiento (Rodríguez 2015).

Los reportes de diálogo copulatorio entre machos y hembras en artrópodos son aún escasos (revisión en Rodríguez 2015). En la araña *Physocyclus globosus* (Pholcidae), los machos presionan el abdomen de las hembras con sus pedipalpos durante la cópula y, cuanto mayor el número de apretones, más alta es la proporción de paternidad. Las hembras estridulan para que el macho detenga momentáneamente los apretones, sobre todo cuando los apretones son largos. Los machos que aflojan los apretones cuando la hembra estridula son los que obtienen mayor éxito de fertilización (Peretti et al. 2006). Similarmente, los machos de la mosca tsetse *Glossina pallipides* (Glossinidae) utilizan estructuras de su genitalia para presionar rítmicamente el abdomen de la hembra y promover la ovulación y el transporte de esperma, así como disminuir la probabilidad de recópula de la hembra (Briceño & Eberhard 2009a,b; 2015). Las hembras realizan comportamientos de vibración alar y sacudidas corporales durante la cópula que llevan al macho a interrumpir dichos apretones pero sin interrumpir la cópula (Briceño & Eberhard 2017). Por último, las hembras de la araña

Allocosa senex (Lycosidae) realizan sacudidas corporales entre y durante montas que llevan al macho a reiniciar la monta y/o la eyaculación (García-Díaz et al. 2015). Con estos comportamientos, las hembras podrían estar mostrando su receptividad y motivando al macho a inseminarla. Entre los comportamientos realizados por las hembras de *P. thorellii*, se describió el corcoveo durante la cópula. La hembra no suelta al macho, no tira hacia atrás y tampoco eleva el abdomen más de lo que el pene puede llegar. Sin embargo, puede llevar a la retracción del pene. Con la cantidad, duración y/o combinación de estos comportamientos, la hembra podría estar mostrando en diferente grado su intención de interrumpir la cópula, lo que podría provocar la realización de más cortejo por parte del macho, similarmente a lo descrito en *G. pallipides* (Chapman et al. 2003; Briceño & Eberhard 2017). Estudios futuros buscarán determinar si realmente existe diálogo copulatorio en *P. thorellii*, evaluando si la interacción comportamental observada lleva a un mayor éxito de fertilización para algunos machos.

Por último, luego de la cópula se observó que la hembra realiza el comportamiento “limpieza de opérculo”. Se modificó la definición del comportamiento reportado por Stanley et al. (2016), ya que al observarlo más en detalle se encontró que el extremo distal del ovipositor entra en contacto directo con la boca de la hembra mientras que la hembra utiliza las uñas de sus pedipalpos para raspar la parte exterior del tronco del ovipositor (ver Tabla 1). Parece ser un comportamiento común en la especie, si bien no se observó en todos los casos. La latencia con la que ocurre este comportamiento luego de la cópula fue muy variada y pudo haber ocurrido también luego de terminadas las observaciones. La función de este comportamiento, como mencionó Stanley et

al. (2016), aún no está establecida. Puede ser simplemente de acicalamiento y/o podemos estar frente a otra instancia de evaluación del macho. La hembra podría estar también descartando esperma, similarmente a lo descrito en la araña *P. globosus* (Peretti & Eberhard 2009; Calbacho-Rosa & Peretti 2015). En el próximo capítulo, se evaluará si la duración de este comportamiento tiene un efecto en la cantidad de espermatozoides almacenados por las hembras. Hasta el momento, este comportamiento (si bien no ha sido reportado formalmente) se ha observado en otras especies de la familia Gonyleptidae (G. Machado, com. pers.), por lo que estudios futuros buscarán determinar la función e importancia del mismo en *P. thorellii* y las restantes especies que lo realizan.

Conclusiones

La cópula de *P. thorellii* es más compleja que lo descrito anteriormente y presenta elementos que sugieren un flujo de información y evaluación recíproca entre los sexos desde el inicio hasta el fin del encuentro. Se observó que:

1. Existen comportamientos femeninos antes de la cópula que podrían estar mostrando su receptividad y cooperando con la inserción e inicio de la transferencia de esperma;
2. El cortejo masculino durante la etapa copulatoria implica no solamente golpes en el dorso de la hembra con los primeros pares de patas sino un posible intercambio de sustancias (contacto buco-genital) y cortejo a nivel genital (vibración de pene y movimientos de inserción) que aumentan las instancias de estimulación por parte del macho y las posibilidades de evaluación femenina;
3. La hembra despliega comportamientos durante la cópula que podrían

estar regulando el cortejo realizado por el macho y por ende la transferencia de esperma y finalmente el éxito de paternidad del mismo.

En este contexto, son precisos más estudios experimentales con *P. thorellii* para determinar la función de los comportamientos mencionados y su relación con el éxito de cópula y fertilización en esta especie.

CAPÍTULO 2

Efecto del cortejo copulatorio sobre el éxito de cópula y transferencia espermática en *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae)

Introducción

Existen tres clases de selección sexual post-copulatoria que pueden actuar con diferente intensidad y no son excluyentes una con otra: la coevolución sexual antagonista (CSA), la competencia espermática (CE) y la elección críptica femenina (ECF) (Eberhard 2015). La CSA surge del conflicto sexual extremo entre machos y hembras al momento de la reproducción (Arnqvist & Rowe 2005). Se habla de una carrera coevolutiva entre ambos sexos, donde los machos intentan controlar los procesos femeninos que afectan la probabilidad de paternidad masculina y las hembras intentan resistir o prevalecer a dicha manipulación, favoreciéndose un sexo en detrimento del otro (Eberhard 2015). Los rasgos desarrollados por los machos buscan manipular o controlar a la hembra, mientras se espera que las hembras desarrollen resistencias y/o contra-adaptaciones que reduzcan dicha manipulación.

Como definimos en el “*Marco teórico*”, la CE se refiere a la competencia entre los eyaculados de dos o más machos por la fertilización de un conjunto de óvulos (Parker 1970; Snook 2005). A la competencia directa entre eyaculados se agregan comportamientos masculinos que influyen en la interacción del espermatozoide con la hembra y que potencialmente pueden sesgar la paternidad a favor de un macho. Algunos de los mecanismos son: (1) remover el espermatozoide previo, (2) empaquetar y empujar el espermatozoide rival hacia rincones dentro del

aparato genital femenino, (3) diluir el esperma de otros machos, (4) matar el esperma de otros machos y (5) poner barreras para que otros machos no inseminen a la hembra (Parker 1970; Simmons 2001; Eberhard 2015). Si bien la CE implica competencia entre eyaculados, no hay que olvidar que el tracto reproductivo femenino es el ambiente en el que ocurre esta competencia. Las condiciones en las que se da la CE están potencialmente influenciadas o mediadas por las hembras (Snook 2005). Por lo tanto, la interacción de la hembra con el esperma no debe ser pasada por alto.

La ECF implica mecanismos (enumerados en el “*Marco teórico*”) por los que la hembra sesga la paternidad a favor de un macho (Eberhard 1996). En el marco de la ECF, se espera que los machos presenten comportamientos y/o estructuras con las que estimulen a las hembras durante y luego de la cópula, y que las hembras desarrollen estructuras sensoriales en los lugares de contacto masculino y/o aumenten su sensibilidad para diferenciar y modular sus respuestas a los estímulos del macho (Eberhard 1985, 2015). De un tiempo a esta parte, se han reportado y estudiado comportamientos que sugieren la estimulación femenina durante la cópula en varias especies de artrópodos (revisado en Peretti & Aisenberg 2015). Dicha estimulación se da por medio de “estructuras no-genitales de cortejo táctil”, o sea, estructuras que posee el macho y que están especializadas para contactar a la hembra en su superficie externa y/o en su tracto genital. Estas estructuras masculinas pueden presentar diseños ornamentados que no responden a una funcionalidad obvia y que divergen rápidamente entre especies emparentadas (Eberhard 1985, 2004). Por ejemplo, machos del grillo *Metrioptera roeselii* tienen órganos asociados al aparato genital denominados “titiladores” que estimulan a la hembra en su genitalia (Wulff et al.

2015). En otros casos, puede que dichas estructuras estimuladoras estén conservadas y sean comunes a varias especies, ya que sirven a otros comportamientos no asociados a la transferencia de esperma. Los machos del escarabajo *Tribolium castaneum*, por ejemplo, utilizan los tarsos de sus patas para raspar los élitros de la hembra durante la cópula (Evanderson & Arqnvist 2016). En arácnidos, los machos de la araña *Leucauge mariana* empujan rítmicamente con sus patas las patas de la hembra durante la cópula, lo cual aumenta la probabilidad de que la hembra coopere con la formación de un tapón copulatorio (Aisenberg & Eberhard 2009).

Para comprobar el efecto de las estructuras de cortejo en el éxito reproductivo de los machos y así determinar si se encuentran bajo elección femenina u otra fuerza de selección, es preciso modificar tanto las estructuras a través de las cuales los machos realizan el estímulo así como la habilidad de la hembra para percibir estos estímulos (e.g., Uetz et al. 1996; Córdoba-Aguilar 2002; Briceño & Eberhard 2009a,b; Polak & Rashed 2009; Aisenberg et al. 2015). Tradicionalmente, la experimentación con dichas estructuras se realiza únicamente sobre machos. Sin embargo, este procedimiento no permite distinguir si, de existir un cambio en la respuesta femenina, este se deba a la modificación del estímulo y/o a un cambio en el comportamiento de los machos en respuesta a la modificación de la estructura (Eberhard 2011). Por esto, la combinación de modificaciones en machos y hembras proporciona un control crucial para distinguir los dos mecanismos mencionados arriba (Aisenberg et al. 2015). En especies que tienen cortejo táctil es posible manipular y limitar tanto la estructura masculina como la habilidad femenina de percibir ese estímulo en particular, sin alterar todo el conjunto de órganos sensitivos (e.g., Eberhard 2002,

2011; Aisenberg et al. 2015; Briceño & Eberhard 2015). Los artrópodos son excelentes modelos para realizar este tipo de experimentos ya que la comunicación táctil es primordial durante las interacciones sexuales y presentan muchos órganos mecano-receptores que pueden ser desactivados de maneras muy específicas (Eberhard 2015).

Los miembros del orden Opiliones (Arachnida) poseen una serie de características que sugieren que la elección críptica femenina podría ser una fuerza importante moldeando las estrategias sexuales del grupo (Machado et al. 2015). Por ejemplo, la gran mayoría de las especies estudiadas es poliginándrica (Machado et al. 2015), los espermatozoides son inmóviles (Morrow 2004), el inicio y la finalización de la cópula parecen estar bajo control femenino, la genitalia masculina es muy compleja morfológicamente (Macías-Ordóñez et al. 2010) y hay un cortejo táctil conspicuo antes, durante y luego de la cópula (Machado et al. 2015). También se observó que las hembras tienen una serie de receptáculos seminales en el ovipositor en los que pueden almacenar esperma (Macías-Ordóñez et al. 2010). Sin embargo, hasta el momento, la mayor parte de los estudios sobre interacciones copulatorias en el grupo son principalmente descriptivos y no analizan los mecanismos que pueden influenciar el éxito reproductivo masculino (Willemart et al. 2006, 2008; Requena & Machado 2014; Stanley et al. 2016).

Pachyloides thorellii (Gonyleptidae) es un opilión que cumple con las características mencionadas arriba. La interacción entre macho y hembra fue descrita en detalle y se encontró que antes y durante la cópula los machos tocan el dorso y las patas de la hembra con el primer par de patas, un comportamiento que fue interpretado como cortejo táctil (Stanley et al. 2016). A

su vez, las hembras parecen tener el control del inicio y duración de la cópula, ya que son capaces de resistir y/o rechazar machos, antes y durante la cópula finalizando el encuentro sexual abruptamente. Stanley et al. (2016) observaron que las hembras de *P. thorellii* abren el opérculo genital para que el macho pueda introducir el pene y cooperan tanto con la sujeción como con la posición de cópula, pues sujetan los quelíceros del macho y mantienen elevado el cuerpo durante la inserción. Por lo tanto, el cortejo táctil (pre-copulatorio y copulatorio) del macho podría ser utilizado para estimular a la hembra a que acepte y se mantenga en cópula (Stanley et al. 2016). Sin embargo, ni esta posible función ni el efecto que pueden tener los comportamientos masculinos sobre los procesos copulatorios y post-copulatorios aparentemente controlados por la hembra, han sido evaluados en ninguna especie del grupo.

En este estudio, se pusieron a prueba dos hipótesis sobre el rol del cortejo táctil pre-copulatorio y copulatorio en *P. thorellii* por medio de experimentos que limitan tanto el cortejo de los machos, como la capacidad de percibir dicho cortejo por parte de las hembras. La primer hipótesis a poner a prueba es que el cortejo táctil que el macho realiza antes y durante la cópula aumenta el éxito de cópula. Cuando las hembras se enfrenten con machos cuyo cortejo táctil pre-copulatorio y copulatorio se encuentre reducido, o cuando las hembras estén experimentalmente limitadas de percibir dicho cortejo masculino, se espera: (A) una menor tasa de aceptación de cópula por parte de las hembras, (B) una mayor tasa de aceptación de segundas cópulas por parte de las hembras ante machos sin tratamiento, (C) una menor duración de cópula que los realizados entre machos y hembras sin tratamiento y (D) una menor cantidad de espermatozoides almacenados por la hembra. En segundo lugar, se puso a prueba la hipótesis de

que la intensidad de cortejo copulatorio táctil afecta la duración de la cópula y la transferencia de esperma. Se espera encontrar que las hembras que copulen con machos que realicen un mayor número de toques con patas I por segundo tendrán cópulas más largas y mayor cantidad de espermatozoides en sus ovipositorios luego de la cópula.

Metodología

Cría y mantenimiento de ejemplares

La descripción detallada del protocolo está presentada en el tópico ‘*Cría y mantenimiento de ejemplares*’ de la metodología del Capítulo 1.

Experiencias comportamentales

Se formaron parejas entre machos y hembras vírgenes durante abril–mayo de 2015 y mayo–junio de 2016 a una temperatura promedio (\pm DS) de $21,6 \pm 1,7$ °C. Se formaron dos grupos experimentales:

‘Machos Tratados’: formado por parejas (N=40) de hembras sin tratamiento (“libres”) y machos con el cortejo copulatorio táctil limitado (“tratados”). Al macho tratado se le limitó el cortejo pegándole la pata I derecha al dorso del escudo dorsal utilizando un trozo de cinta de papel (2 mm de ancho x 15 mm de largo, Fig. 1A) 24 h antes de la experiencia. En el mismo momento, se colocó a la hembra en un terrario cuadrado de vidrio (15 x 15 cm de base x 4 cm de altura) con arena como sustrato, un trozo de tronco como refugio y un algodón humedecido. Al inicio de las observaciones, un macho tratado fue colocado en la arena en el lado opuesto al que se encontraba una hembra libre.

Luego de la experiencia, la cinta fue removida para permitir el libre movimiento de la pata I del macho.

‘Hembras Tratadas’: formado por parejas (N=40) de machos libres y hembras cuya capacidad de percibir el cortejo táctil masculino fue reducida (“tratadas”). Se limitó la sensibilidad de la hembra al cortejo masculino 24 h antes de la experiencia colocándole una capa muy fina de cerámica fría adherida al dorso (Fig. 1B). Al inicio de las observaciones, un macho libre fue colocado en la arena en el lado opuesto al que se encontraba la hembra tratada. Luego de finalizada la experiencia, la capa de cerámica fue removida del dorso de cada hembra con un paño con agua tibia.

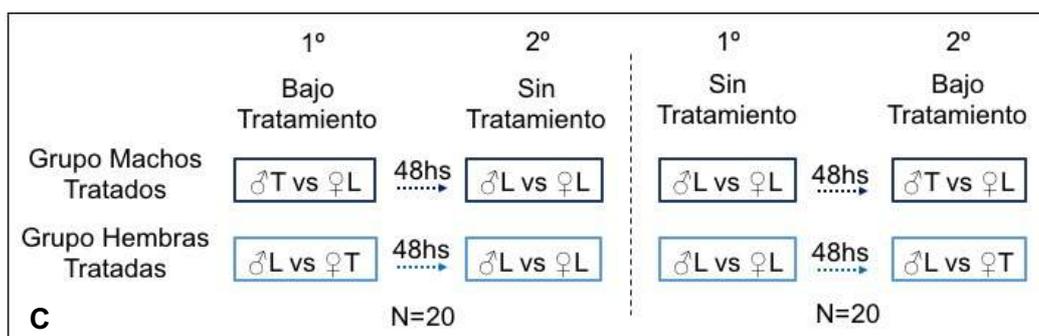


Figura 1. Grupos experimentales. (A) Macho de *Pachyloides thorellii* bajo tratamiento (MT): se limitó el cortejo táctil pegándole la pata I derecha al dorso del escudo dorsal utilizando un trozo de cinta de papel (flecha negra). (B) Hembra de *P. thorellii* bajo tratamiento (HT): se limitó la sensibilidad al cortejo táctil masculino colocándole una capa muy fina de cerámica fría adherida al dorso (flecha negra). En ambos grupos experimentales, individuos tratados (machos o hembras) fueron apareados con individuos libres (L) del sexo opuesto. (C) Secuencia temporal de los experimentos de apareamiento. Del total de 40 parejas en cada grupo experimental, 20 empezaron con apareamientos entre individuos tratados vs libres (lado izquierdo del cuadro) y 20 empezaron con apareamientos entre individuos libres vs libres (lado derecho del cuadro). En las fotos (A) y (B), la barra de referencia es de 5 mm.

Los tratamientos realizados para ambos grupos fueron reversibles y por lo tanto no dejaron secuelas en los individuos. Se realizaron pruebas piloto en las que se colocó a los individuos bajo tratamiento con ejemplares sin tratamiento y se comparó su velocidad de movimiento, capacidad de alimentarse, cortejar y aparearse. Los individuos bajo los diferentes tratamientos se mueven, alimentan, cortejan y aparean de manera similar que los individuos sin tratamiento.

Las parejas de cada grupo experimental fueron observadas en dos situaciones con 48 h de diferencia entre ellas: (1) un miembro de la pareja (macho o hembra) bajo tratamiento y el otro libre, (2) el mismo miembro de la pareja (macho o hembra) que fue tratado en la situación (1) ahora sin tratamiento (libre) y el otro se mantuvo libre (Fig. 1C). Del total de 40 parejas en cada grupo experimental, 20 empezaron con encuentros entre individuos tratados y libres, mientras las restantes 20 empezaron con encuentros entre individuos libres (Fig. 1C). Este procedimiento fue usado para evitar un posible sesgo del orden de los apareamientos en los resultados.

Una experiencia se contó como válida si ocurría cortejo por parte del macho. De no observarse cortejo, la pareja se volvió a enfrentar bajo las mismas condiciones hasta tres veces. De no observarse cortejo por parte del macho en ninguna de las tres oportunidades, la pareja era disuelta y extraída de los análisis. A las parejas que copularon en el primer encuentro, se les impidió copular en el segundo encuentro (se separó a la pareja en el momento en que se observó el inicio de la inserción del pene en el opérculo genital femenino). Este procedimiento fue usado para asegurarnos de que el espermatozoides recibido por la hembra fuera únicamente de una cópula.

Las experiencias comportamentales se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones descritas en el Capítulo 1. Todas las experiencias fueron video-grabadas y los videos analizados posteriormente para cuantificar la frecuencia de conductas masculinas y femeninas. En la etapa pre-copulatoria se registró: (a) tiempo neto de cortejo masculino (i.e., tiempo en que el macho se encontró tocando a la hembra con sus patas I–II), (b) intensidad de cortejo (i.e., número de toques con patas I por segundo), (c) intensidad de cortejo inmediatamente previo a la inserción (i.e., número de toques por segundo desde el último rechazo femenino previo a que se de la inserción) y (d) frecuencia de rechazos de la hembra (i.e., número de veces que la hembra baja el cuerpo, tira hacia atrás y/o se aleja del macho dividido por la duración total del cortejo pre-copulatorio).

En la etapa copulatoria, se registró: (a) duración de la cópula (i.e., tiempo desde la inserción hasta la retracción del pene del opérculo genital femenino), (b) frecuencia de rechazos de la hembra (i.e., número de rechazos de la hembra divididos por la duración total de la etapa copulatoria), (c) frecuencia de corcoveos de la hembra (i.e., número de corcoveos de la hembra divididos por la duración total de la etapa copulatoria), (d) tiempo neto de cortejo masculino (i.e., únicamente el tiempo en que el macho tocó a la hembra con sus patas I), (e) tiempo de contacto entre boca de la hembra y la vaina del pene, (f) tiempo de vibración del pene, (g) intensidad de cortejo (i.e., número de toques con patas I por segundo), (h) frecuencia de movimientos de inserción del macho (i.e., número de movimientos de inserción del pene dividido por la duración total de la cópula) y (i) qué integrante de la pareja finalizó la cópula. Se analizó el comportamiento de corcoveo de la hembra separadamente de los rechazos (que comprendieron cuando la hembra baja el cuerpo, tira hacia atrás y/o se aleja del

macho) con el fin de evaluar si tenían efectos diferentes sobre la duración de la cópula y el número de espermatozoides en los receptáculos femeninos. En relación a la última variable (qué integrante finaliza la cópula), consideramos que la hembra finalizó la cópula cuando ésta realizó algún comportamiento de rechazo inmediatamente previo a la retracción del pene y consideramos que el macho finalizó la cópula cuando éste retiró el pene mientras la hembra mantuvo la posición de cópula.

Finalmente, en la etapa post-copulatoria, se registró la duración de limpieza del opérculo genital realizada por la hembra. Para el cálculo de intensidad de cortejo en todas las etapas, los períodos de cortejo fuera de foco fueron contados en el tiempo total de cortejo pero restados de dicho total para hallar la frecuencia de toques por segundo.

Las hembras fueron pesadas y medidas (largo del escudo dorsal) antes de cada experiencia (ver detalles de toma de dimensiones corporales y de peso en el Capítulo 1). Las hembras pertenecientes al grupo HT fueron pesadas con y sin capa para determinar el peso de la la capa. La capa incrementa, en promedio, un 12% el peso de las hembras (DS = 6%). Los machos fueron medidos luego de cada encuentro. Se obtuvo un índice de diferencia de tamaño (DT) para cada pareja (largo del escudo dorsal de hembras dividido por el largo del escudo dorsal de machos) para obtener un único valor de tamaño por pareja que expresara cuál de los integrantes era el de mayor tamaño (DT < 1: macho de mayor tamaño que hembra; DT = 1: ambos de igual tamaño; DT > 1: macho de menor tamaño que hembra). Luego de finalizadas ambas experiencias previstas para cada pareja, las hembras copuladas fueron sacrificadas por hipotermia y se contó el número de espermatozoides presentes en sus

receptáculos seminales siguiendo el protocolo obtenido a partir de análisis preeliminares.

Disección y conteo de espermatozoides

Las hembras sacrificadas se mantuvieron en freezer (Whirlpool WVG28HBDWX) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su disección. La disección se realizó en solución salina y bajo lupa estereoscópica (OLYMPUS SZ-61). Primero se realizó un corte a lo largo de los márgenes laterales del escudo dorsal y se levantó el escudo dorsal exponiendo el aparato digestivo del individuo (Fig. 2A). Luego, se extrajeron todos los órganos hasta visualizar las gónadas y el ovipositor (Fig. 2B). Se retiró el aparato genital femenino y se tomaron fotografías del mismo sobre hoja milimetrada, para posteriormente realizar mediciones del ovipositor (Fig. 2C). Finalmente, se extrajo el extremo distal del ovipositor, cortando la estructura aproximadamente a 2 mm del ápice, y el tronco del ovipositor, cortando la estructura cerca de su base (Fig. 2D). Cada parte se trituró con pinza y se colocó en 50 μL de solución salina preparada según el protocolo de Snow & Andrade (2005) para conteo de espermatozoides en arañas.

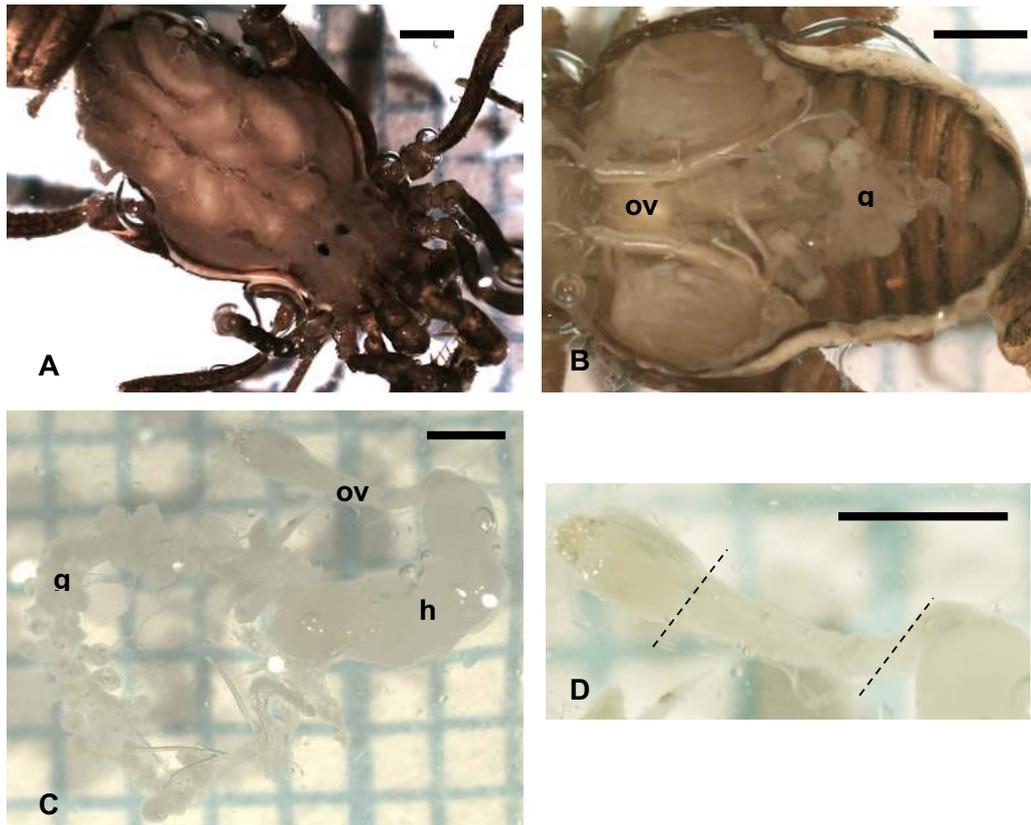


Figura 2. Paso a paso de la disección de hembras de *Pachyloides thorellii*. (A) Exposición del aparato digestivo después de la remoción del escudo dorsal. (B) Localización del aparato genital, ubicado bajo el aparato digestivo. (C) Extracción del aparato genital: (ov) ovipositor, (g) gónada, (h) huevos maduros sin fecundar. (D) Ovipositor ampliado. Las líneas punteadas indican dónde se realizaron los cortes en el ovipositor. Las fotografías se tomaron sobre hoja milimetrada. Barras de referencia = 1 mm.

El procesamiento de las muestras para conteo de espermatozoides se realizó siguiendo la técnica propuesta por Snow & Andrade (2005). Luego de procesada la muestra, se colocaron 10 μ L de solución en una cámara de Neubauer (0,100 mm profundidad, 0,0025 m^2) y se contaron todos los espermatozoides presentes en cada subdivisión (16 por cuadrante) de los cuatro cuadrantes ubicados en los vértices de la cámara que no estuviesen en contacto con el borde inferior y derecho de cada subdivisión (Fig. 3).

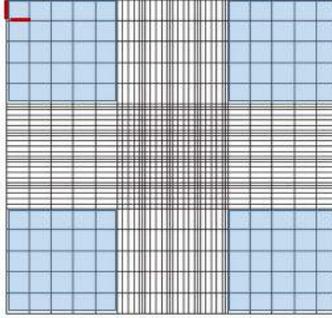


Figura 3. Cámara de Neubauer. En celeste se resaltan los cuadrantes en los que se realizó el conteo. En rojo se marcan los bordes en los que, de haber espermatozoides, no fueron consideradas (esto se repitió para todos los cuadrantes).

Para calcular el número de espermatozoides por muestra se utilizó la siguiente fórmula: $\text{Espermatozoides totales} = (\text{número de espermatozoides contados} * \text{volumen total}) / \text{Volumen total de los cuadrantes}$. En este estudio, volumen total = 50 μL y volumen total de los cuadrantes = 0,4 μL (hay 64 subdivisiones y cada una de ellas contiene 0,00625 μL). El conteo de espermatozoides se realizó bajo microscopio (OLYMPUS CH S). El entrenamiento sobre la técnica de conteo de espermatozoides se llevó a cabo con el asesoramiento de los Dres. David Vrech y Alfredo Peretti del Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Análisis estadísticos

Para determinar el efecto del tratamiento en los comportamientos femeninos y masculinos pre-copulatorios que podrían influenciar la probabilidad de aceptación de cópula, realizamos modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Como variable respuesta se consideró: en el modelo 1, la intensidad de cortejo pre-copulatorio (IPC), en el modelo 2, la duración de dicho cortejo

(DPC) y, en el modelo 3, la frecuencia de rechazos femeninos pre-copulatorios (FRPC). En todos los modelos, se analizó y corroboró la distribución normal de las variables respuesta por medio del test de Shapiro-Wilk. Como variable explicativa para dichos modelos se consideró solamente el grupo experimental (HT y MT). Se incluyó la identidad de la pareja como efecto aleatorio debido a que la misma pareja fue enfrentada en dos situaciones, o sea, con tratamiento y sin tratamiento (Fig. 1C). La predicción fue que los machos bajo tratamiento (MT) tengan una menor intensidad de cortejo pre-copulatorio y que la limitación en la capacidad de percibir el cortejo en las hembras (HT) aumente la duración de los cortejos pre-copulatorios. También se esperó que ambos grupos experimentales cuyos individuos se encuentren bajo tratamiento (HT y MT) tengan una mayor frecuencia de rechazos que los grupos sin tratamiento (HL y ML).

Posteriormente, tomamos los comportamientos que mostraron ser afectados por el grupo experimental y el índice de diferencia de tamaño corporal entre machos y hembras (DT) y realizamos otro GLMM (modelo 4) para determinar el efecto de dichas variables explicativas sobre la probabilidad de cópula, que fue la variable respuesta. Modelamos la distribución de la variable respuesta como binomial (si o no) y usamos “logit” como función de enlace. A partir del modelo saturado inicial, se redujeron las variables utilizando el Criterio de Información de Akaike (Zuur et al. 2009). Se consideró al modelo más plausible como el que tuviera el menor valor de AIC y a todos los modelos que difirieran por menos de dos unidades de éste como igualmente plausibles (Burnham & Anderson 2002). En el modelo 4, todas las variables explicativas fueron centradas y estandarizadas previamente al ajuste de modelos para poder

comparar los efectos de cada una de ellas y facilitar la interpretación de los modelos (Schielzeth 2010).

Para analizar si existían diferencias en la duración de la cópula y la cantidad de espermatozoides presente en los receptáculos femeninos entre grupos experimentales (con y sin tratamiento), se realizaron dos modelos lineales generalizados (GLM). El modelo 5 tuvo como variable respuesta la duración de la cópula (DC) y el modelo 6 tuvo como variable respuesta el número de espermatozoides en los receptáculos seminales femeninos (espermatozoides totales). La variable DC presentó una distribución normal y se consideró que el número de espermatozoides totales tenía una distribución Quasi-Poisson, pues los datos presentaban sobre-dispersión (su varianza era mayor que su media). Ambos modelos tuvieron como variable explicativa solamente los grupos experimentales.

Luego, se realizaron dos GLM adicionales para determinar qué variables comportamentales podrían estar influenciando la duración de la cópula y la cantidad de espermatozoides presentes en los receptáculos femeninos. El modelo 7 tuvo como variable respuesta la DC y como variables explicativas las mismas variables utilizadas en el modelo 4 (pero en la etapa copulatoria), más la frecuencia de movimientos de inserción (FMI) y la frecuencia de corcoveos (FC) femeninos durante la cópula. El modelo 8 tuvo como variable respuesta los espermatozoides totales y como variables explicativas las mismas que el modelo 7, más la DC y la duración de la limpieza del opérculo (DLO). En ambos modelos (7 y 8), se trabajó únicamente con las variables simples y no se incluyeron interacciones debido al bajo número de datos obtenidos en los experimentos. Nuevamente, las variables explicativas fueron centradas y estandarizadas

previamente. Para seleccionar las variables a incluir en los modelos 7 y 8 y determinar su grado de correlación se realizó el test de correlación de Pearson. Las variables altamente correlacionadas entre si ($r > 0,7$ y $p < 0,05$) fueron removidas de los modelos.

Los análisis fueron realizados con el programa PAST 3.0 (Hammer et al. 2003) y con el programa R versión 3.3.2 (R Development Core Team 2016). Para realizar los GLMMs, utilizamos la librería *lme4* (Bates et al. 2015) y para la comparación de dichos modelos la librería *MuMin* (Barton 2015). Para la selección de GLMs, se utilizó la librería *MASS* (Venables & Ripley 2002).

Resultados

Aceptación de cópula

Sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en el modelo para intensidad de cortejo pre-copulatorio (modelo 1). Encontramos que los machos bajo tratamiento cortejan con una intensidad menor al grupo de machos sin tratamiento (promedio \pm DS: MT = $3,48 \pm 1,08$ toques/s; ML = $5,70 \pm 1,67$ toques/s; $t = 8,89$, $p < 0,001$). La intensidad de cortejo pre-copulatorio de machos con hembras bajo tratamiento no tuvo diferencias con la intensidad de cortejo pre-copulatorio ante hembras sin tratamiento (promedio \pm DS: HT = $6,91 \pm 2,00$ toques/s; HL = $7,09 \pm 2,01$ toques/s; $t = 25,88$, $p = 0,61$).

A partir de este resultado, realizamos la comparación de modelos para la aceptación de cópula considerando como variables explicativas del modelo saturado la intensidad de cortejo pre-copulatorio (IPC) y el índice de diferencia de tamaño corporal entre individuos (DT). El mejor modelo incluye únicamente la intensidad de cortejo pre-copulatorio (Tabla 1). El modelo más plausible

siguiente al mejor modelo ($\Delta AICc = 1,3$) agrega el índice de diferencia de tamaño corporal entre individuos (Tabla 1). En ambos modelos, una mayor IPC lleva a un aumento en la aceptación de la cópula (Fig. 4; Tabla 2).

Tabla 1. Selección de modelos para describir los factores que influyen en la aceptación de la cópula en *Pachyoides thorellii*. IPC = Intensidad de cortejo pre-copulatorio; DT = Índice de diferencia de tamaño (macho/hembra). (gl) grados de libertad; (Δ) delta; (w) peso.

Modelos candidatos	Coeficientes de las variables explicativas			gl	Log-likelihood	AICc	ΔAIC	w
	Intercepto	DT	IPC					
IPC	-1,56	-	0,93	3	-71,38	148,9	0,00	0,66
IPC + DT	-1,58	0,21	0,96	4	-70,98	150,2	1,30	0,34
Nulo	-1,35	-	-	2	-81,43	166,9	18,02	0,00
DT	-1,35	0,09	-	3	-81,32	168,8	19,89	0,00

Tabla 2. Efecto de las variables significativas ($p < 0,05$) incluidas en el mejor modelo (GLMM, mejor modelo $w = 0,657$) sobre la aceptación de la cópula en *Pachyoides thorellii*. IPC = Intensidad de cortejo pre-copulatorio.

	Coeficiente	Error standard	Z	P
Intercepto	-15,55	2,23	-6,81	< 0,001
IPC	0,93	0,24	3,97	< 0,001

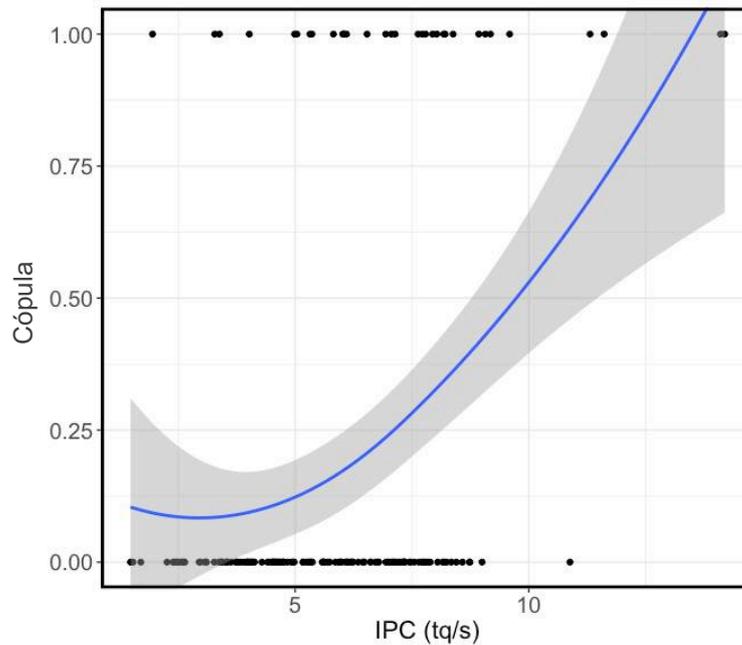


Figura 4. Probabilidad de aceptación de cópula en el opilión *Pachyloides thorellii* para la Intensidad de cortejo pre-copulatorio (IPC) variable con efecto significativo según el mejor modelo.

De los machos rechazados en su primer cortejo (N=148 de 160), el 97% volvió a cortejar a la hembra durante la misma experiencia. Se evaluó si la intensidad del cortejo pre-copulatorio varía, y de qué manera, a medida que el número de rechazos femeninos dentro de la misma experiencia aumenta. Se encontró que la intensidad de cortejo pre-copulatorio varía a lo largo de la exposición pero no sigue ningún patrón de aumento o disminución identificable, ni al comparar grupos experimentales, ni encuentros con o sin cópula (Fig. 5). El número máximo de veces en que los machos reiniciaron el cortejo antes de acceder a la cópula fue menor en los grupos sin tratamiento de ambos grupos experimentales (HL=7 vs HT=9; ML=5 vs MT=15; Fig. 5).

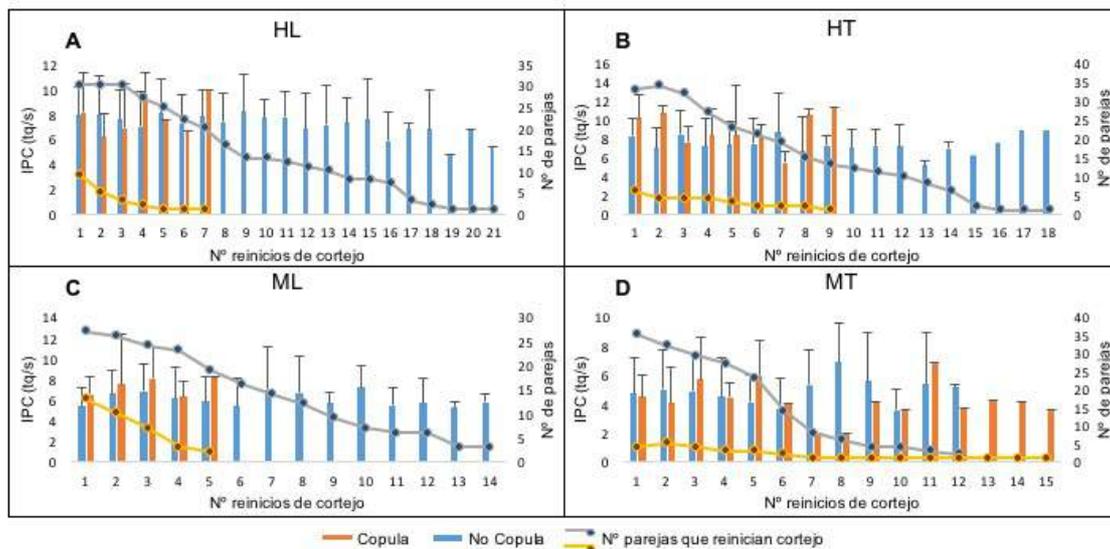


Figura 5. Variación a lo largo del encuentro de la intensidad de cortejo pre-copulatorio (IPC; toques/s) para parejas del opilión *Pachyoides thorellii* que copularon y que no copularon. Gráfico de barras = Intensidad de cortejo precopulatorio; Gráfico de líneas = número de parejas. (A) Grupo Hembras Sin tratamiento; (B) Grupo Hembras Bajo tratamiento; (C) Grupo Machos Sin tratamiento; (D) Grupo Machos Bajo tratamiento.

Al relacionar la intensidad de cortejo pre-copulatorio con la duración del mismo para las parejas en las que se dio la cópula, los machos con cortejos pre-copulatorios más intensos accedieron a la cópula antes (regresión lineal: $F = 3,92$ $b = -0,31$ $p < 0,001$).

Aceptación de segundas cópulas

Solamente dos de las 40 hembras aceptaron una segunda cópula. Las cópulas se dieron en un caso con un macho sin tratamiento (ML) y en el otro con un macho bajo tratamiento (MT). La intensidad de cortejo pre-copulatorio fue similar entre los machos cuando estaban bajo tratamiento y cuando estaban sin tratamiento (MT = 5,81 toques/s y 3,56 toques/s; ML = 9,92 toques/s y 9,18 toques/s). La duración del cortejo pre-copulatorio en los segundos encuentros parece haber sido menor que en el primero (ML: 1^{er} = 46 s y 2^{do} = 33 s; MT: 1^{er} = 365 s y 2^{do} = 23 s). La duración de la cópula tuvo diferencias muy notorias entre

los machos (58 s en ML y 888 s en MT) al igual que la intensidad de cortejo copulatorio y el conteo de espermatozoides. El macho con la cópula más corta no realizó cortejo copulatorio y la hembra realizó comportamientos de rechazo desde el momento de la inserción hasta la separación de la pareja. Al contar los espermatozoides almacenados por las hembras, encontramos una menor cantidad de espermatozoides en la cópula corta con respecto a la cópula prolongada (375 espermatozoides y 1250 espermatozoides, respectivamente).

Duración de cópula

Al analizar los comportamientos realizados por el macho durante la cópula, se encontró que la duración de la vibración del pene y el contacto buco-genital no difirieron entre grupos experimentales y se encontraron altamente correlacionados entre sí (Tabla 3), así como con la duración del cortejo copulatorio y la duración de la cópula. Por lo tanto, estas variables no fueron consideradas para los modelos de duración de cópula y conteo de espermatozoides a seguir.

Tabla 3. Matriz de correlación para las variables copulatorias: duración de cópula (DC), duración de cortejo táctil (DCT), duración de vibración del pene (DVP), duración de contacto buco-genital (DCB-G) y duración de cortejo táctil, vibración del pene y contacto pene-boca simultáneamente (DCVP). Sobre la diagonal se encuentra el valor de p para el test de correlación de Pearson; debajo de la diagonal se encuentran los índices de correlación del test.

	DC	DCT	DVP	DCB-G	DCVP
DC	—	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
DCT	0,98	—	<0,001	<0,001	<0,001
DVP	0,80	0,80	—	<0,001	<0,001
DCB-G	0,87	0,90	0,77	—	<0,002
DCVP	0,75	0,76	0,95	0,84	—

No se encontraron diferencias en la duración de la cópula entre los grupos experimentales (Fig. 6). A partir de este resultado, se realizó la selección de modelos incluyendo en el modelo saturado la IPC (variable significativa para el modelo 4), la intensidad de cortejo copulatorio (ICC), la frecuencia de movimientos de inserción (FMI), la frecuencia de corcoveos femeninos (FC) y el índice de diferencia de tamaño corporal entre individuos (DT). El mejor modelo para la duración de la cópula incluyó únicamente la intensidad de cortejo copulatorio. Se observó que cortejos copulatorios más intensos llevan a cópulas más prolongadas (Fig. 7; Tabla 4). Las restantes variables incluidas en el modelo saturado no tuvieron efecto sobre la duración de la misma.

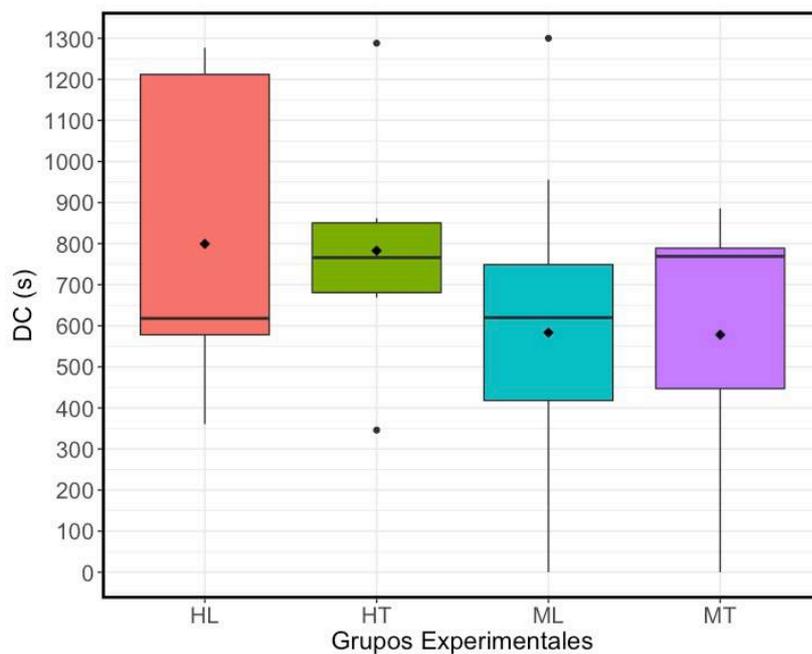


Figura 6. Duración de cópula (DC) en el opilión *Pachyloides thorellii* para cada grupo experimental. (—) Mediana para cada grupo; (•) Outliers; (♦) Media para cada grupo. Valores de (N) para cada grupo experimental: Hembras Sin tratamiento (HL) = 9; Hembras Bajo tratamiento (HT) = 6; Machos Sin tratamiento (ML) = 12; Machos Bajo tratamiento (MT) = 4.

Tabla 4. Resultado del mejor modelo (GLM) para describir la duración de la cópula en *Pachyloides thorellii*. La intensidad de cortejo copulatorio (ICC) tiene un efecto positivo en la duración de la cópula.

	Coefficiente	Error standard	<i>t</i>	<i>P</i>
Intercepto	677,79	50,29	13,48	<0,001
ICC	204,68	51,07	4,01	<0,001

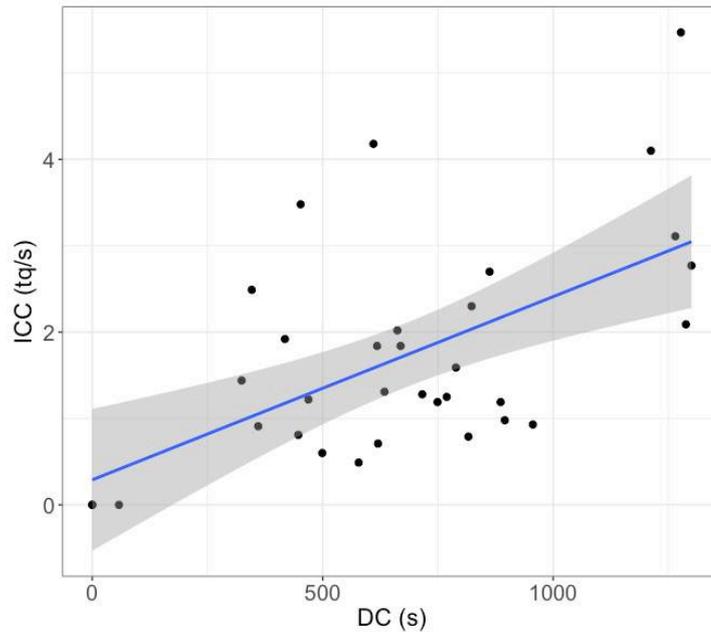


Figura 7 Duración de la cópula (DC) versus la intensidad de cortejo copulatorio (ICC) en toques/s para el opilión *Pachyloides thorellii* de acuerdo con el mejor modelo (ver Tabla 4).

Luego de la inserción, los machos en todos los grupos experimentales redujeron paulatinamente la intensidad de cortejo a lo largo de la cópula (Fig. 8). No se observó una asociación entre intensidad de cortejo copulatorio y los comportamientos femeninos de corcoveo o rechazo para ninguno de los grupos. Tampoco encontramos diferencias entre la frecuencia de corcoveos ni de rechazos durante la cópula entre grupos experimentales.

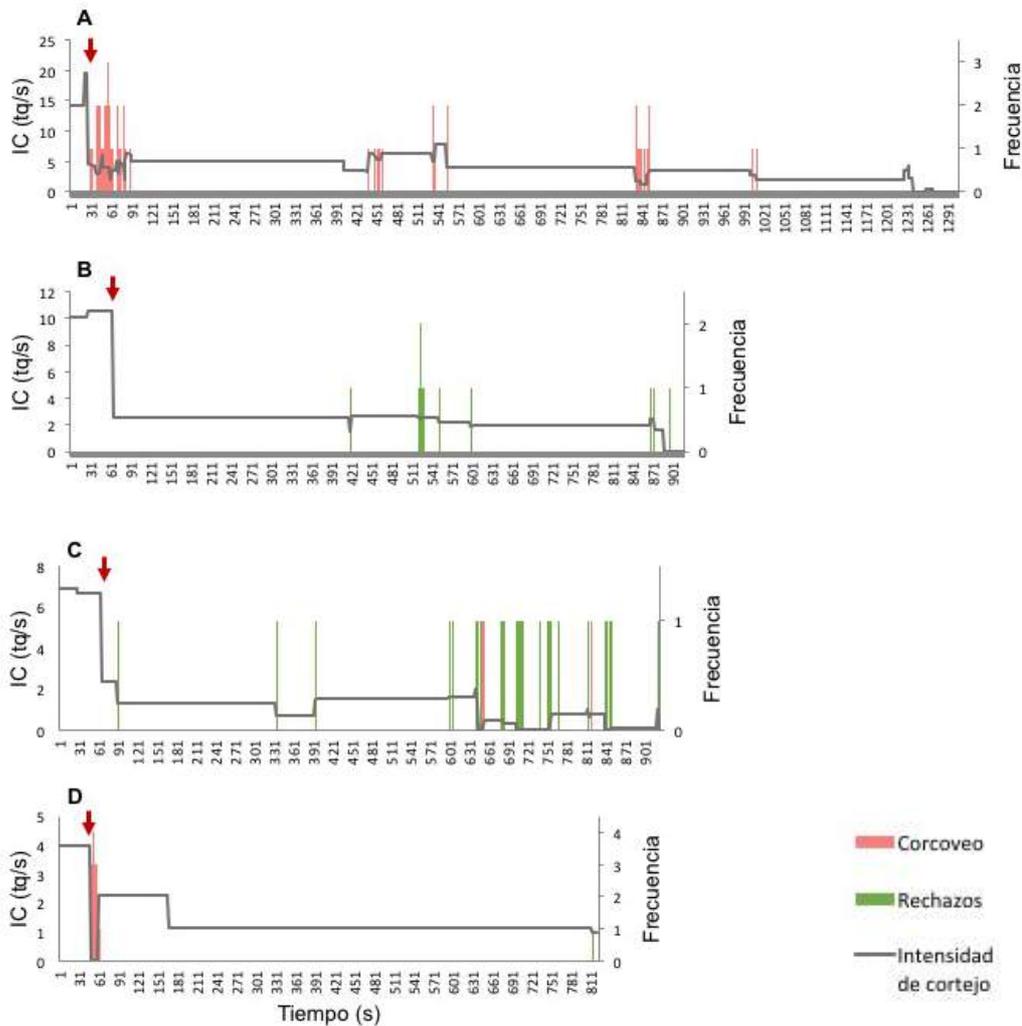


Figura 8. Variación en la intensidad de cortejo (IC), corcoveos y rechazos a lo largo de las etapas pre-copulatoria y copulatoria en *Pachyloides thorellii*. Se seleccionó una cópula promedio de cada grupo para mostrar patrones generales. Gráfico de línea = Intensidad de cortejo (IC); Gráfico de barras = Frecuencia de corcoveos y rechazos (Frecuencia). En todos los gráficos la flecha roja indica cuándo se dio la inserción (fin del cortejo pre-copulatorio, inicio del cortejo copulatorio) (A) Grupo Hembra Sin tratamiento (HL); (B) Grupo Hembra Bajo tratamiento (HT); (C) Grupo Macho Sin tratamiento (ML); (D) Grupo Macho Bajo tratamiento (MT).

Conteo de espermatozoides

No se encontraron diferencias en la cantidad de espermatozoides presentes en los receptáculos seminales femeninos entre grupos experimentales (Fig. 9).

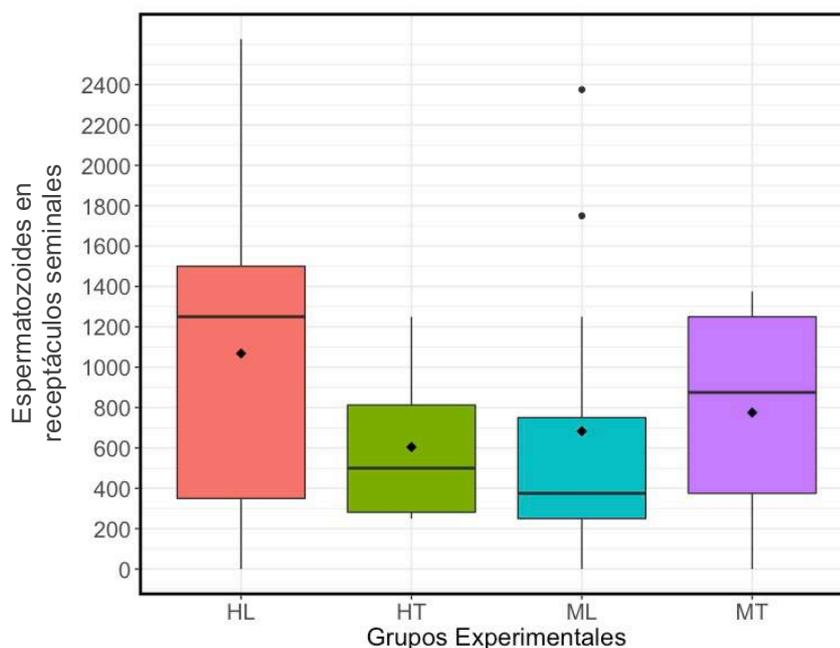


Figura 9. Conteo de espermatozoides almacenados por hembras del opilión *Pachyloides thorellii* para cada grupo experimental. (—) Mediana para cada grupo; (♦) Media para cada grupo; (•) Outliers.

En este caso, incluimos en el modelo saturado la intensidad de cortejo pre-copulatorio (IPC) y copulatorio (ICC), la frecuencia de movimientos de inserción (FMI), la frecuencia de corcoveos (FC), la diferencia de tamaño (DT), la duración de la limpieza del opérculo (DLO) y la duración de la cópula (DC). El modelo indica que la DC aumenta la cantidad de espermatozoides en los receptáculos femeninos (Tabla 5). Por lo tanto, mientras más prolongadas son las cópulas, mayor es la cantidad de espermatozoides que son almacenados por las hembras (Fig. 10). La IPC, ICC, FMI, FC, DT y DLO no influenciaron la cantidad de espermatozoides en los receptáculos femeninos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultado del modelo (GLM) para describir el conteo de espermatozoides en los receptáculos seminales femeninos en *Pachyoides thorellii*. La duración de la cópula (DC) es la variable que tiene un efecto significativo en la cantidad de espermatozoides presentes en los receptáculos seminales. (IPC) Intensidad de cortejo pre-copulatorio; (ICC) Intensidad de cortejo copulatorio; (FC) frecuencia de corcoveos; (DT) índice de diferencia de tamaño entre machos y hembras; (FMI) frecuencia de movimientos de inserción; (DLO) duración de limpieza del opérculo.

	Coefficiente	Error standard	t	P
Intercepto	6,51	0,16	40,56	<0,001
IPC	-0,09	0,17	-0,54	0,60
ICC	0,03	0,20	0,16	0,87
FC	-0,19	0,20	-0,95	0,35
DT	0,19	0,14	1,35	0,19
FMI	0,24	0,19	1,29	0,21
DLO	-0,02	0,17	-0,12	0,90
DC	0,47	0,19	2,48	0,02

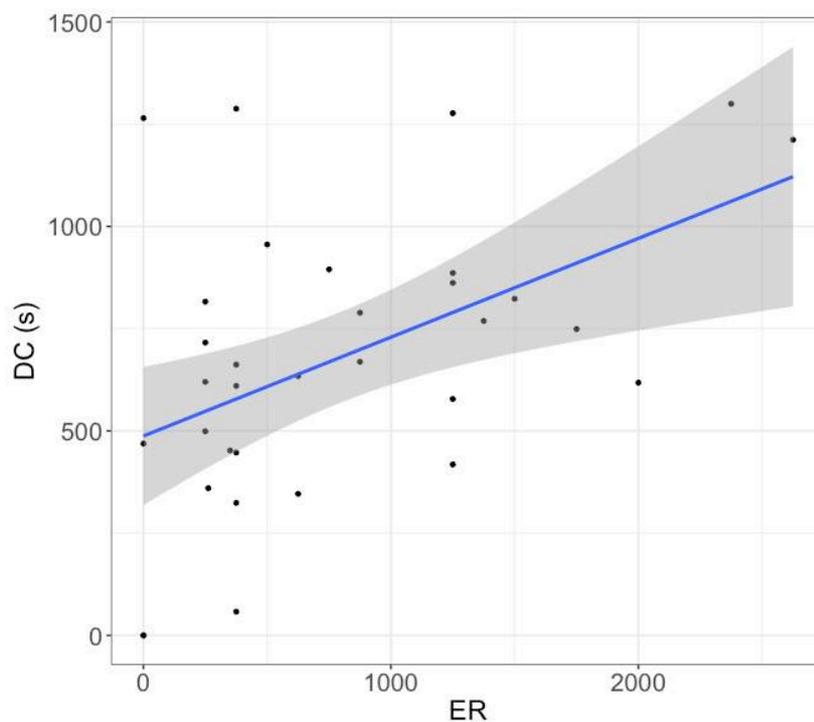


Figura 10. Cantidad de espermatozoides en receptáculos seminales femeninos (ER) versus duración de cópula (DC) en el opilión *Pachyoides thorellii* de acuerdo con el mejor modelo (ver Tabla 5).

Discusión

En general, se encontró que la limitación del cortejo pre-copulatorio táctil de los machos de *P. thorellii* redujo la aceptación de cópulas por parte de las hembras de acuerdo con la predicción 1A. Sin embargo, al reducir la percepción de dicho cortejo por las hembras, no se observaron diferencias en la aceptación de cópula. Además, a diferencia de lo esperado por nuestra predicción 1B, no hubo una mayor aceptación de segundas cópulas en parejas cuya primer cópula se diera con alguno de sus integrantes bajo tratamiento (MT o HT). En cuanto a la duración de cópula y la cantidad de espermatozoides presentes en los receptáculos femeninos, se esperaba observar cópulas más cortas y menor cantidad de espermatozoides en parejas bajo tratamiento (predicciones 1C-D). Sin embargo, no se encontraron dichas diferencias entre los grupos experimentales. Por último, se corroboró la hipótesis de que la intensidad de cortejo pre-copulatorio y copulatorio de los machos aumenta la probabilidad de aceptación de cópula y la duración de la misma, respectivamente. A su vez, las cópulas más prolongadas estuvieron asociadas con una mayor cantidad de espermatozoides en los receptáculos seminales femeninos.

Modificaciones de las estructuras

Las modificaciones experimentales en estructuras de percepción femeninas no tuvieron efectos mayores sobre la aceptación de cópula y demás variables registradas, en comparación con las modificaciones en estructuras complementarias masculinas. Estos resultados difieren de lo encontrado en otros grupos de artrópodos en los cuales se realizaron experimentos similares y los efectos del tratamiento sobre hembras fueron mayores que los efectos en

machos (ver ejemplos en: Eberhard 2001, 2002; Briceño & Eberhard 2009a,b; Aisenberg et al. 2015). Considerando que la intensidad de cortejo táctil pre-copulatorio y copulatorio afecta tanto el acceso como la duración de la cópula respectivamente, es posible que la diferencia encontrada en el efecto de los tratamientos se deba a que las vibraciones que producen los toques sobre la hembra sean más importantes que el contacto directo entre las patas I y el dorso de la hembra. Se encontró también que el grupo de hembras bajo tratamiento (HT) tampoco difirió radicalmente del grupo sin tratamiento para ninguna de las variables comportamentales cuantificadas. Una limitante de este estudio es que quizás los machos logren detectar que hay algo ajeno a la hembra sobre ella, modifiquen el lugar donde realizan el cortejo y, de esta manera, el efecto del tratamiento en las hembras se haya visto reducido. El primer par de patas de los Opiliones es muy sensible y es utilizado para detectar e identificar elementos a corta distancia (Curtis 1970; Willemart et al. 2009). Los machos pueden haber detectado la capa de cerámica y haber redirigido el cortejo hacia zonas del cuerpo de la hembra que estuviesen descubiertas. En la araña lobo *Schizocosa rovnari*, por ejemplo, se observó que el macho puede modificar su cortejo de acuerdo al sustrato y contexto para mejorar su éxito reproductivo (Sullivan-Beckers & Hebets 2014).

Durante las experiencias comportamentales, observamos que los machos cortejan sobre el dorso y tocan alternativamente el fémur de las patas III de la hembra. Si bien a simple vista no notamos diferencias en el lugar donde el macho realizó los toques en el grupo de hembras bajo tratamiento, al cuantificar la intensidad de cortejo (pre-copulatorio y copulatorio), no diferenciamos entre cortejo en el dorso y cortejo en las patas, por lo que de haber una relación entre

el lugar del cortejo y los resultados obtenidos, no fue cuantificada. Determinar que elementos del cortejo táctil son evaluados (por ejemplo, vibración y/o contacto) y si el macho de *P. thorellii* logra detectar elementos ajenos a la hembra y modificar su cortejo en consecuencia es necesario para esclarecer este punto y profundizar en el conocimiento tanto de la plasticidad comportamental de los individuos como de los componentes que forman y pueden ser evaluados en las señales táctiles en esta especie.

Cortejo pre-copulatorio y éxito de cópula

De acuerdo con lo esperado, los machos de *P. thorellii* que realizaron cortejos pre-copulatorios más intensos tuvieron mayor probabilidad de acceder a la cópula (Fig. 4) y lo hicieron más rápido que machos que realizaron cortejos menos intensos. En el Capítulo 1, se describe que las hembras deben abrir voluntariamente el opérculo genital para que la cópula ocurra ya que no se ha observado ningún mecanismo por el cual los machos puedan forzar la cópula en Opiliones (Machado et al. 2015). Además, encontramos que las hembras colaboran activamente evirtiendo el ovipositor si el macho no dirige correctamente el pene y que pueden interrumpir el cortejo en cualquier momento. En la araña *Leucauge mariana*, los machos tampoco son capaces de forzar la cópula y se encontró que a través del cortejo persuaden a las hembras a realizar una serie de comportamientos sin los cuales la cópula no podría darse (Aisenberg et al. 2015). En este contexto, proponemos que las características que permiten el acceso a la cópula se encuentran bajo selección femenina y que los machos, a través de los toques, estarían estimulando a la hembra para que abra su opérculo y permita la inserción.

Se esperaría que los machos aumenten la intensidad de cortejo pre-copulatorio una vez rechazados. Sin embargo, esto no ocurrió en *P. thorellii*. La intensidad de cortejo pre-copulatorio osciló entre aumentos y disminuciones a lo largo de cada experiencia tanto para parejas en las cuales finalmente se dio la cópula como para las que no. Si la intensidad de cortejo es lo que las hembras evalúan para acceder a la cópula, se espera que los machos realicen la mayor intensidad posible desde el comienzo para aumentar la probabilidad de copular y que la mantengan el mayor tiempo posible o hasta acceder a la cópula. Sin embargo, si dicho rasgo fuera un reflejo de la calidad del macho (por ejemplo, de su condición corporal), eso lo transformaría en una señal costosa que no todos los machos podrían realizar del mismo modo y que cada macho lo haría según su condición (Zahavi & Zahavi 1997). Hoefler et al. (2009) encontraron que la tasa de cortejo en la araña lobo *Pardosa milvina* es un indicador honesto de la calidad del macho y que las hembras que se aparearon con machos cuya tasa de cortejo era mayor produjeron más descendencia, que eclosionó en menor tiempo y con mayor tasa de supervivencia que hembras que se aparearon con machos que cortejaban a tasas bajas.

En opiliones, Requena & Machado (2015) proponen que las hembras de *Iporongaia pustulosa* son capaces de evaluar la condición corporal de los machos por medio de carbohidratos cuticulares durante los toques en las interacciones de apareamiento. La condición corporal de los machos en esta especie es importante ya que luego de la cópula las hembra oviponen y el macho se queda cuidando la puesta hasta la eclosión (Machado et al. 2004). Durante el período de cuidado paternal, la condición corporal del macho decrece y son capaces de abandonar la puesta para salir a forrajear, poniendo en riesgo la

supervivencia de su descendencia (Requena et al. 2012). Por lo tanto las hembras preferirían machos en mejor condición corporal, lo que puede incrementar su éxito reproductivo (Requena & Machado 2015). Estudios que cuantifiquen si hay una variación en la intensidad de cortejo pre-copulatorio en machos de *P. thorellii* con diferente condición corporal son necesarios para determinar si la intensidad de cortejo es una señal costosa y si la condición del macho se ve reflejada en sus carbohidratos cuticulares. Así mismo, evaluar el efecto que tiene dicha diferencia en la aceptación de cópula y características de la descendencia (e.g., número, tiempo de eclosión y tasa de supervivencia) permitirá determinar si las hembras obtienen información sobre la calidad de los machos por medio de la intensidad del cortejo o por sus carbohidratos cuticulares y si la elección de machos en buena condición incrementa el éxito reproductivo de las hembras.

Aceptación de segundas cópulas

No fue posible poner a prueba este punto ya que únicamente en dos casos obtuvimos recópula. Las cópulas y recópulas fueron en diferentes grupos experimentales y tuvieron desenlaces contradictorios. En el caso de la cópula en el grupo de machos sin tratamiento (ML), inmediatamente luego de que la hembra aceptó la cópula y el macho insertó, la hembra comenzó a tirar violentamente de la sujeción hasta que logró la separación. Si bien el macho no tenía limitado su cortejo, tuvo la cópula más corta y uno de los conteos de espermatozoides en los receptáculos femeninos más bajos. En la cópula observada en el grupo de machos bajo tratamiento (MT), tanto su duración como la cantidad de espermatozoides cuantificados en los receptáculos fueron

concordantemente mayores. Si bien hablamos de dos casos únicamente y nada puede ser puesto a prueba estadísticamente al respecto, estas observaciones sugieren que las hembras de *P. thorellii* tienen gran control sobre la duración cópula (Stanley et al. 2016) y que existiría una relación, en la que más adelante ahondaremos, entre la duración de la cópula y la transferencia espermática.

En ambos casos mencionados arriba, diferentes factores pueden estar causando que la hembra acepte una recópula. En el primer caso, si bien la intensidad de cortejo pre-copulatoria fue alta, la primer cópula fue corta y la cantidad de espermatozoides en los receptáculos fue baja. Esto puede llevar a la hembra a estar más receptiva a aceptar una recópula. Aisenberg & Costa (2005) encontraron que la presencia de esperma en los receptáculos femeninos aumenta la reluctancia a nuevas cópulas en la araña lobo *Schizocosa malitiosa*. En la misma línea, una de las respuestas más comunes en hembras de insectos a la presencia de fluidos seminales en sus receptáculos es la disminución de las recópulas (Chen 1984). En el otro caso, la hembra aceptó copular con un macho cuyo cortejo pre-copulatorio tenía baja intensidad, por lo tanto, se podría esperar que al experimentar cortejos de intensidad mayor aceptara la cópula. Alternativamente, es posible que la hembra estuviese muy receptiva, por lo que cortejos pre-copulatorios menos intensos podrían ser suficientes para que aceptara la cópula. La edad de los individuos es un factor que puede afectar la receptividad de las hembras (Manning 1967). Sin embargo, en este trabajo, todas las hembras y los machos tenían la misma edad y fueron criados bajo las mismas condiciones. Es necesario, por lo tanto, aumentar el número de recópulas para poder obtener conclusiones más concretas al respecto.

Cópula y conteo de espermatozoides

Se observó que las cópulas siguen un patrón similar en todos los grupos experimentales. Después que se da la inserción, la intensidad de cortejo copulatorio masculino baja drásticamente y continúa descendiendo paulatinamente hasta el fin de la cópula. Este descenso puede darse porque, como mencionamos anteriormente, los machos no logren mantener tal intensidad de cortejo durante mucho tiempo y su función principal sea lograr que la hembra acceda a la cópula. Los machos podrían estar invirtiendo mucha energía en acceder a la cópula y luego podrían utilizar otros elementos para estimular o prolongar la duración de la cópula. En el opilión *Leiobunum vittatum*, los machos se basan en fuertes sujeciones y forcejeos para sujetar a la hembra y acceder a la cópula para luego durante la cópula intercambiar sustancias y toques con patas (Fowler-Finn et al. 2014). En el Capítulo 1, se observó y describió que los machos, además del cortejo copulatorio táctil, realizan vibraciones a nivel genital (dentro de la genitalia femenina) y colocan la vaina del pene en contacto con la boca de la hembra, por lo que estos comportamientos podrían estar complementando o incluso sustituyendo dicho cortejo táctil.

Cortejos multimodales se han descrito y estudiado en varias especies de arácnidos (e.g., Foelix 2011; Stafstrom & Hebets 2013; Girard et al. 2015; Kosak & Uetz 2016). Dichos cortejos pueden ser adaptativos y aumentar el éxito reproductivo de los individuos al reducir errores o costos de la elección de pareja, al proveer información sobre la identidad de la especie, sobre un recurso ofrecido, o incluso sobre la calidad de la pareja (Candolin 2003). En este contexto, las diferentes señales dentro del cortejo pueden ofrecer información sobre diferentes aspectos de la calidad de la pareja (Møller & Pomiankowski

1993; Johnstone 1997). Por otro lado, pueden explotar una preferencia preexistente y reducir el *fitness* del que recibe la señal al ser manipulado para que reduzca su resistencia a la cópula (Candolin 2003). En el caso de *P. thorellii*, si interpretamos tanto la vibración del pene como el contacto buco-genital como parte del cortejo masculino durante la cópula, junto a los toques con patas I y II, podríamos considerar el cortejo copulatorio en esta especie como un cortejo multimodal ya que implica dos canales de comunicación (táctil y gustativo). En esta especie, la manipulación de la hembra por parte del macho no parece una explicación muy probable ya que la hembra tiene un rol activo durante la cópula y tendría el control tanto de la duración del cortejo como del tipo de cortejo realizado por el macho (ver Discusión del Capítulo 1). Por lo tanto, se supone que los comportamientos realizados por el macho durante la cópula, están bajo ECF y la hembra los utilizaría de manera complementaria para obtener mayor información sobre la calidad de macho. Sin embargo, exactamente qué información obtiene la hembra de cada uno de ellos aún es incierta.

Al comparar las duraciones de la vibración del pene y el contacto buco-genital con las restantes duraciones de variables de cortejo masculino, se encontró que ambas tienen una correlación positiva con la duración de la cópula (Tabla 3). Una posibilidad es que esta correlación sea simplemente producto de que ambos comportamientos ocurren únicamente durante la cópula y que una mayor duración de cópula permite una mayor duración de estos comportamientos. Sin embargo, es probable que el efecto de estos comportamientos esté ayudando a aumentar la duración de la cópula a través de diferentes formas de estimulación femenina, como mencionamos en el párrafo anterior (ver Discusión del Capítulo 1). La ausencia de diferencias en la

duración de la cópula entre grupos experimentales bajo tratamiento y sin tratamiento podría indicar que la hembra está obteniendo información a partir de estos comportamientos, reduciendo o directamente eliminando el efecto de la limitación del cortejo táctil. Para aclarar este punto, es necesario determinar la importancia de estos comportamientos para la duración de la cópula, transferencia espermática y, finalmente, éxito reproductivo de los machos. Por lo tanto, estudios futuros buscarán cuantificar la vibración del pene realizada por el macho, determinar si está transfiriendo alguna sustancia durante el contacto buco-genital y relacionar estas variables con la duración de cópula y proporción de paternidad.

De acuerdo con nuestra hipótesis, encontramos que machos con cortejos copulatorios más intensos tienen cópulas más prolongadas y que cópulas más largas dejan mayor cantidad de espermatozoides en los receptáculos femeninos. La intensidad de cortejo copulatorio masculino lleva a la hembra a copular por más tiempo, lo cual le permitiría al macho transferir mayor cantidad de espermatozoides. No hay hasta el momento otros trabajos en Opiliones donde se hayan cuantificado y comparado estas variables. Sin embargo, la presencia de cortejo copulatorio y el efecto de dichos rasgos comportamentales y/o morfológicos masculinos en la duración de cópula está bien reportada en otros artrópodos (revisado en Peretti & Aisenberg 2015). Entre las hipótesis de selección sexual post-copulatoria que pueden estar actuando sobre este rasgo, la CSA predice que si el macho, al realizar mayor intensidad de cortejo copulatorio, está manipulando o influenciando a la hembra para que aumente la duración de la cópula cuando esto es desventajoso para ella, se observarían en la hembra estructuras o comportamientos asociados a las zonas de estimulación

para reducir su efecto (Eberhard 2004). No se observaron hasta el momento este tipo de rasgos en hembras de *P. thorellii*. Además, Stanley et al. (2016) reportaron que las hembras tienen la capacidad de terminar la cópula en cualquier momento, lo cual le da a la hembra un control de la duración de la cópula mayor al esperado bajo CSA.

Por otro lado, en un marco de ECF, el cortejo copulatorio del macho estimularía a la hembra a permitir cópulas más prolongadas y así lograr transferir mayor cantidad de espermatozoides. Si bien la duración de la cópula es una buena aproximación de la transferencia espermática y el éxito de paternidad en algunas especies, no podemos generalizar este patrón para todas las especies (Schneider et al. 2006). Los machos podrían transferir espermatozoides continuamente durante toda la duración de la cópula, como ocurre en la mosca escorpión *Panorpa cognata* en la que la transferencia de esperma se da linealmente a lo largo de la cópula y cópulas más prolongadas transfieren más esperma (Engqvist & Sauer 2003). Por el contrario, los machos podrían dedicar una parte de la cópula a transferir espermatozoides y otra a diversos procesos que procuren aumentar su éxito reproductivo. En la araña *Latrodectus hasselti*, por ejemplo, se encontró que la probabilidad de paternidad está positivamente relacionada con la duración de la cópula (Andrade 1996), mientras que la transferencia de esperma ocurre únicamente en una fracción de dicha duración (Snow & Andrade 2004). Andrade & MacLeod (2015) proponen que el aumento de la paternidad no se debería únicamente a una mayor cantidad de esperma, sino que podría ser resultado de la acción de proteínas que el macho estaría transfiriendo durante las cópulas más largas, las cuales afectan la fertilización. Otra posibilidad que plantean las autoras es que la hembra permita cópulas más

largas con machos que ella prefiera y posteriormente sesgue la paternidad hacia ellos (Snow & Andrade 2004).

A partir de las observaciones realizadas en el presente estudio, no es posible asegurar que los machos de *P. thorellii* transfieran espermatozoides durante toda la cópula. Como se discutió en el Capítulo 1 para especies de Laniatores, los movimientos de inserción podrían ser los momentos en los que el macho transfiere espermatozoides (Macías-Ordóñez et al. 2010). De ser así, es probable que efectivamente la transferencia se dé durante toda la cópula ya que estos comportamientos se distribuyen a lo largo de la misma. Sin embargo, esto no ha sido comprobado aún. Por lo tanto, si bien no encontramos una relación directa entre la intensidad de cortejo copulatorio y la cantidad de espermatozoides cuantificados en las hembras, no podemos descartar que la intensidad de dicho cortejo tenga un efecto en la paternidad del macho.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, se vuelve necesario realizar estudios de paternidad en *P. thorellii*. Si bien observamos y relacionamos positivamente la cantidad de espermatozoides presentes en la genitalia femenina con la duración de la cópula y ésta a su vez con la intensidad de cortejo copulatorio, no podemos afirmar que la cantidad de espermatozoides encontrados sea directamente proporcional a la descendencia que ese macho tendría con esa hembra (Eberhard 1996). En especies donde el reservorio del esperma está separado del ducto de fertilización, las hembras pueden redirigir esperma a través de los mismos mecanismos de transporte con los que los lleva del lugar de almacenamiento al de fertilización (Eberhard 1996). Recordemos que en Laniatores los machos no alcanzan los receptáculos seminales femeninos para depositar el esperma, sino que lo hacen en el lumen del

ovipositor (Macías-Ordóñez et al. 2010) y que los espermatozoides son inmóviles (Morrow 2004). Teniendo en cuenta esto y que la hembra puede copular con varios machos antes de oviponer, es posible que la hembra opte por dejar espermatozoides en el lumen para que sea retirado por otro macho en una nueva cópula por medio de los movimientos de inserción y vibración del pene. También la hembra podría expulsar el espermatozoides ella misma al limpiarse el opérculo, así como transportar el espermatozoides del macho o machos seleccionados a los receptáculos para posteriormente fertilizar sus huevos. Ninguna de estas hipótesis fue puesta a prueba en ésta, ni en ninguna otra especie de opilión.

Como se ve a partir de este trabajo, existen aún grandes vacíos de información en Opiliones debido a la baja cantidad de estudios que pongan a prueba diferentes mecanismos de selección sexual. *Pachyloides thorellii* ofrece grandes posibilidades de estudiar mecanismos de selección sexual post-copulatorios (ECF, CE y CSA), poniendo a prueba diferentes hipótesis y predicciones. Si bien aún falta determinar si los rasgos comportamentales masculinos tienen un efecto en la paternidad, dadas las características de la especie y ante lo registrado en este estudio, es muy probable que la selección sexual en *P. thorellii* se de principalmente por ECF. Sin embargo, existe todo un campo, el de la CE, que aún no se ha explorado y que seguramente afecte los resultados de los procesos copulatorios. Se desconoce cómo varían los comportamientos del macho y las respuestas femeninas al variar el estatus reproductivo de la misma, o al estar ante la presencia de otro macho. Si existe y qué consecuencias tiene la interacción de eyaculados dentro del tracto femenino, son algunas de las preguntas que surgen al pensar esta posibilidad.

Conclusiones

El cortejo pre-copulatorio y copulatorio (toques con patas I y II) realizado por los machos de *P. thorellii* tiene un efecto positivo tanto en el éxito de cópula como en la duración de la misma. Por lo tanto, podría ser un rasgo que las hembras estuviesen evaluando para sesgar la paternidad de los machos. Los machos de esta especie obtendrían la cópula invirtiendo en calidad de cortejo y no en estructuras para retener y/o forzar a la hembra como ocurre en otras especies del orden (e.g., Burns et al. 2012, 2013).

Encontramos que durante la etapa pre-copulatoria, las hembras acceden a copular con mayor frecuencia y más rápidamente con machos que realizan cortejos pre-copulatorios más intensos. Adicionalmente, tenemos evidencias de que los machos no serían capaces de forzar la cópula ya que, al aumentar la frecuencia de rechazos por parte de la hembra, se reduce la probabilidad de cópula.

La intensidad de cortejo no se mantiene constante a lo largo de toda la interacción copulatoria. Casi inmediatamente luego de la inserción (etapa copulatoria), la intensidad de cortejo disminuye radicalmente y continúa disminuyendo paulatinamente hasta que finaliza la cópula. Es posible que el cortejo táctil sea energéticamente costoso y que no pueda ser mantenido por los machos durante todo el tiempo de cópula por lo que realicen su gasto energético mayor para obtener la cópula y luego utilicen otros comportamientos (como vibración del pene y contacto buco-genital) para compensar la reducción en el cortejo táctil.

La duración de la cópula, y no la intensidad de cortejo copulatorio, tiene un efecto directo en la cantidad de espermatozoides presentes en las hembras.

Por lo tanto, los machos podrían estar invirtiendo en cortejo copulatorio para aumentar la duración de la cópula y así transferir más esperma. Si bien los resultados sugieren que la hembra podría estar evaluando al macho a partir de dicho cortejo y prefiriendo machos con cortejos copulatorios más intensos, aún es preciso evaluar si existe una relación entre este comportamiento y la proporción de paternidad alcanzada por el macho para demostrar si el cortejo táctil está siendo seleccionado por elección críptica femenina.

CONCLUSIONES GENERALES Y ESTUDIOS FUTUROS

En este trabajo se evaluó el comportamiento sexual del opilión *Pachyloides thorellii*, particularmente el papel del cortejo táctil masculino en el éxito de cópula, duración de la misma y transferencia de espermatozoides. Los resultados obtenidos sugieren que el cortejo táctil masculino es un rasgo importante y decisivo al momento de acceder y mantenerse en cópula. Las hembras prefieren aparearse, y por más tiempo, con machos que cortejen con mayor intensidad antes y durante la cópula.

Se encontró que el comportamiento sexual es más complejo de lo descrito anteriormente para esta especie, contando con comportamientos tanto masculinos como femeninos que sugieren un flujo de información bidireccional y una posible evaluación antes y durante la cópula. Para comprobar este punto, estudios futuros buscarán establecer qué tan costoso es el cortejo táctil masculino y si es reflejo de su condición corporal. De ser una señal costosa y honesta sobre su condición se esperaría que:

- Al variar la condición corporal de los machos, la intensidad del cortejo pre-copulatorio y copulatorio varíe de manera similar, o sea, machos en mejor condición cortejarían más intensamente que machos en condición corporal más baja;
- Al enfrentarse a hembras, éstas prefieran copular con machos de mayor condición corporal, con cortejos pre-copulatorios más intensos;

Estos estudios se complementarán con la búsqueda de hidrocarburos cuticulares en machos y hembras de *P. thorellii*. La posibilidad de que dichos compuestos reflejen la condición del individuo y que ésta sea evaluada por las

hembras abre puertas interesantes para futuros estudios. De existir este tipo de compuestos, los machos podrían evaluar a la hembra al inicio del de cortejo y modificarlo en función de la calidad de la hembra, realizando cortejos pre-copulatorios y copulatorios más intensos ante hembras de mayor calidad.

Asimismo, se buscará determinar si la rapidez con la que la hembra realiza los comportamientos de “protrusión de la boca” y “apertura de opérculo” responde únicamente a su grado de receptividad, si son respuestas al cortejo del macho, o una combinación de ambos factores.

Se encontraron dos nuevos comportamientos realizados por el macho de *P. thorellii* durante la cópula, además del cortejo táctil, que pueden tener funciones estimuladoras, la “vibración de pene” y el “contacto buco-genital”. Se observó que cuando el macho no está realizando los tres comportamientos en simultáneo, la hembra despliega comportamientos (e.g., “corcoveos”) que llevan al macho a efectuar más estimulación durante la cópula. Con dichos comportamientos, la hembra podría estar regulando el tipo de cortejo del macho. Estudios futuros analizarán en detalle la estructura de la genitalia masculina para determinar si existe alguna glándula que pueda producir alguna sustancia de la cual la hembra se esté alimentando y/o esté evaluando. Es necesario complementar estos estudios morfológicos con estudios comportamentales en los que se limiten experimentalmente estos comportamientos para evaluar las respuestas de la hembra y analizar cómo interactúan las estructuras genitales masculinas con el aparato reproductor femenino durante la etapa pre-copulatoria y copulatoria.

Los resultados indican que los machos de *P. thorellii* cortejarían a las hembras durante la cópula para obtener cópulas más prolongadas y transferir

mayor cantidad de espermatozoides. Actualmente, la información con la que se cuenta sobre la transferencia de esperma en el grupo proviene solamente de inferencias sobre las estructuras observadas en la genitalia de las especies. Por lo que se vuelve importante investigar cómo se da la transferencia espermática en el grupo. Algunas preguntas que necesitan respuestas son: (1) el macho ¿transfiere esperma a lo largo de toda la cópula o únicamente en una fracción de la misma?; (2) el macho ¿transfiere únicamente espermatozoides?; (3) ¿la cantidad de espermatozoides transferidos por el macho coincide con la cantidad de espermatozoides cuantificados en las hembras? Finalmente, es preciso determinar qué sucede con el esperma una vez dentro del tracto reproductivo de la hembra, cómo interacciona con el esperma de otros machos, cuándo se da el transporte del esperma a los receptáculos seminales, cuánto esperma es transportado, cómo se da el llenado de los receptáculos seminales a medida que aumenta el número de cópulas y el rol de la limpieza del opérculo luego de la cópula en todos estos procesos. *P. thorellii* es un modelo ideal para llevar adelante todos estos estudios.

En este estudio, se observó que la intensidad del cortejo táctil pre-copulatorio y copulatorio masculino parece ser un rasgo decisivo al momento de acceder y mantenerse en cópula respectivamente. La hembra podría estar evaluando a los machos durante la interacción copulatoria (etapa pre-copulatoria y copulatoria) y prefiriendo machos que realicen cortejos más intensos. El siguiente paso para comprender qué tan importante es el cortejo táctil para el éxito reproductivo de los machos en esta especie, es evaluar el efecto de diferentes intensidades de cortejo pre-copulatorio y copulatorio en la proporción de paternidad de los machos.

En este estudio, se estableció un protocolo de conteo de espermatozoides para hembras de Opiliones. Si bien es un avance significativo ya que permite relacionar diversas variables tanto comportamentales como morfológicas con la cantidad de espermatozoides presentes en las hembras, aún no es posible establecer con exactitud si los espermatozoides encontrados pertenecen a los receptáculos seminales y/o al lumen del ovipositor. Por lo tanto, sería interesante continuar refinando esta técnica para lograr obtener y cuantificar los espermatozoides de cada receptáculo seminal por separado.

Esta tesis es el primer estudio experimental con hembras vírgenes en el que se pone a prueba el efecto del cortejo pre-copulatorio y copulatorio táctil masculino en el éxito de cópula y la transferencia de espermatozoides en Opiliones. Estudios comparativos en las demás especies del género *Pachyloides*, así como en otras especies del suborden Laniatores son necesarios para establecer un contexto más completo sobre cómo evolucionaron los comportamientos y estructuras de cortejo masculinas y las respuestas femeninas, y qué mecanismos de selección pueden ser responsables de los mismos.

Las características comportamentales, fisiológicas y morfológicas, así como la facilidad de mantenimiento de individuos en laboratorio, transforman a *P. thorellii* en un muy buen modelo para conocer y poner a prueba mecanismos de selección sexual pre- y post-copulatoria en Opiliones. Si bien recién se están iniciando los estudios a nivel experimental en la especie, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la elección críptica femenina podría tener un rol importante entre los posibles mecanismos de selección sexual post-copulatoria actuando sobre la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L. & Machado, G. 2007. Diet and foraging. En: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds). Harvestmen: the biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge.
- Aisenberg, A. & Costa, F.G. 2005. Females mated without sperm transfer maintain high sexual receptivity in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. *Ethology* 111:545–558.
- Aisenberg, A. & Eberhard, W.G. 2009. Female cooperation in plug formation in a spider: effects of male copulatory courtship. *Behavioral Ecology* 20:1236–1241.
- Aisenberg, A., Barrantes, G. & Eberhard, W. 2015. Hary kisses: tactile cheliceral courtship affects female mating decisions in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 69:313–323.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton.
- Andersson, M. & Simmons, L.W. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 21:296–302.
- Andrade, M.C. 1996. Sexual selection for male sacrifice in the Australian redback spider. *Science* 271:70–72.
- Andrade, M C. & MacLeod, E.C. 2015. Potential for CFC in black widow (genus *Latrodectus*): mechanisms and social context. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects. Springer, Nueva York.
- Arnqvist, G. & Rowe, L. 2005. Sexual conflict. Princeton University Press, Princeton.

- Barton, K. 2015. MuMIn: Multi-Model Inference. R package versión 1.15.1. Disponible en <http://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67:1–48.
- Birkhead, T. & Møller, A.P. 1998. Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego.
- Briceño, R.D. & Eberhard, W.G. 2009a. Experimental modifications imply a stimulatory function for male tsetse fly genitalia, supporting cryptic female choice theory. *Journal of Evolutionary Biology* 22:1516–1525.
- Briceño, R.D. & Eberhard, W.G. 2009b. Experimental demonstration of possible cryptic female choice on male tsetse fly genitalia. *Journal of Insect Physiology* 55:989–996.
- Briceño, R.D. & Eberhard W.G. 2015. Species-specific behavioral differences in tsetse fly genital morphology and probable cryptic female choice. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). *Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Briceño, R.D. & Eberhard, W.G. 2017. Copulatory dialogues between male and female tsetse flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Insect Behavior* 30:394-408.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R. 2002. *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer, Nueva York.
- Burns, M., Hedin, M. & Shultz, J. 2012. Molecular phylogeny of the leiobunine harvestmen of eastern North America (Opiliones: Sclerosomatidae: Leiobuninae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:291-298.

- Burns, M., Hedin, M. & Shultz, J. 2013. Comparative analyses of reproductive structures in harvestmen (Opiliones) reveal multiple transitions from courtship to precopulatory antagonism. *PLoS ONE* 8:e66767.
- Buzatto, B.A. & Machado, G. 2008. Resource defense polygyny shifts to female defense polygyny over the course of the reproductive season of a neotropical harvest-man. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:85–94.
- Buzatto, B.A. & Machado, G. 2014. Male dimorphism and alternative reproductive tactics in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Behavioral Processes* 109:2–13.
- Buzatto, B.A., Macías-Ordóñez, R. & Machado, G. 2013. Macroecology of harvestman mating systems. En: Macedo, R.H. & Machado, G. (eds). *Sexual selection: perspectives and models from the neotropics*. Elsevier, Massachusetts.
- Calbacho-Rosa, L. & Peretti, A.V. 2015. Copulatory and post-copulatory sexual selection in haplogyne spiders, with emphasis on Pholcidae and Oonopidae. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). *Cryptic Female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Candolin, U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews* 78:575-595.
- Chapman, T., Arnquist, G., Bangham, J. & Rowe, L. 2003. Sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 18:41–47.
- Chen, P.S. 1984. The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Annual Review of Entomology* 29:233–255.

- Córdoba-Aguilar, A. 2002. Sensory trap as the mechanism of sexual selection in a damselfly genitalic trait (Insecta: Calopterygidae). *The American Naturalist* 160:594–601.
- Curtis, D.J. 1970. Comparative aspects of the fine structure of the eyes of Phalangida (Arachnida) and certain correlations with habitat. *Journal of Zoology* 160:231–265.
- Curtis, D. J. & Machado, G. 2007. Capítulo 7: Ecology. En: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G (eds). *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge.
- Darwin, C.R. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex*. Princeton University Press, Princeton.
- García-Díaz, V., Aisenberg, A. & Peretti, A.V. 2015. Communication during copulation in the sex-role reversed wolf spider *Allocosa brasiliensis*: Female shakes for soliciting new ejaculations? *Behavioural Processes* 116:62-68.
- Eberhard, W.G. 1985. *Animal genitalia and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- Eberhard, W.G. 1991. Copulatory courtship in insects. *Biological Reviews* 66:1–31.
- Eberhard, W.G. 1994. Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications of cryptic female choice. *Evolution* 48:711–733.
- Eberhard, W.G. 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton.
- Eberhard, W.G. 2000. Criteria for demonstrating postcopulatory female choice. *Evolution* 54:1047–1050.

- Eberhard, W.G. 2001. The functional morphology of species-specific clasping structures on the front legs of male *Archisepsis* and *Palaeosepsis* flies (Diptera, Sepsidae). *Zoology Journal of the Linnean Society* 133:335–368.
- Eberhard, W.G. 2002. Physical restraint or stimulation? The function(s) of the modified front legs of male *Archisepsis diversiformis* (Diptera, Sepsidae). *Journal of Insect Behavior* 15:831–850.
- Eberhard, W.G. 2004. Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. *Journal of Arachnology* 32:545–556.
- Eberhard, W.G. 2009. Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106:10025–10032.
- Eberhard, W.G. 2010. Evolution of genitalia: theories, evidence and new directions. *Genetica* 138:5–18.
- Eberhard, W.G. 2011. Experiments with genitalia: a commentary. *Trends in Ecology and Evolution* 26:17–21.
- Eberhard, W.G. 2015. Cryptic female choice and other types of post-copulatory sexual selection. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). *Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Eberhard, W.G. & Huber, B.A. 1998. Courtship, copulation and sperm transfer in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae) with implications for higher classification. *Journal of Arachnology* 26:342–368.
- Emlen, S.T. & Oring, L.W. 1977. Ecology, sexual selection, and evolution of mating systems. *Science* 197:215–223.

- Engqvist, L. & Sauer, K.P. 2003. Determinants of sperm transfer in the scorpionfly *Panorpa cognata*: male variation, female condition and copulation duration. *Journal of Evolutionary Biology* 16:1196–1204.
- Evandersson, M. & Arnqvist, G. 2016. Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the Royal Society, Biological Series* 267:559-563.
- Fernández, R., Sharma, P.P., Tourinho, A.L. & Giribet, G. 2017. The Opiliones tree of life: shedding light on harvestmen relationships through transcriptomics. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Series* 284:20162340.
- Foelix, R.F. 2011. *Biology of spiders*. Oxford University Press, New York.
- Fowler-Finn, K.D., Triana, E. & Miller, O.G. 2014. Mating in the harvestman *Leiobunum vittatum* (Arachnida: Opiliones): from premating struggles to solicitous tactile engagement. *Behaviour* 151:1663–1686.
- Girard, M.B., Elias, D.O. & Kasumovic, M.M. 2015. Female preference for multimodal courtship: multiple signals are important for male mating success in peacock spiders. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Series* 282:20150000.
- Giuliani, L. 2008. *La familia Gonyleptidae en el Uruguay (Arachnida, Opiliones)*. Licenciatura en Ciencias Biológicas, Montevideo.
- Greenfield, M.D. 2002. *Signalers and receivers: mechanisms and evolution of arthropod communication*. Oxford University Press, New York.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P. D. 2003. *Past Palaeontological*, version 3.18 [Internet]. Disponible en <https://folk.uio.no/ohammer/past/>

- Hoefler, Ch.D., Carlascio, A.L., Persons, M.H. & Rypstra, A.L. 2009. Male courtship repetability ana potential indirect genetic benefits in a wolf spider. *Animal Behaviour* 78:183-188.
- Johnstone, R.A. 1997. Capítulo 7: The evolution of animal signals. En: Krebs JR & Davies NB (eds) *Behavioural Ecology. An Evolutionary Approach*. Blackwell Science, Oxford
- Karaman, I.M. 2005. Evidence of spermatophores in Cyphophthalmi (Arachnida, Opiliones). *Revue Suisse de Zoologie* 112:3–11.
- Kosak, E.C. & Uetz, G.W. 2016. Cross-modal integration of multimodal courtship signals in a wolf spider. *Animal Cognition* 19:1173–1181.
- Kury, A.B. 2003. Annotated catalogue of the Laniatores of the New World (Arachnida, Opiliones). *Revista Ibérica de Aracnología*, volúmen especial monográfico, 335 p.
- Kury, A.B. 2015. Classification of Opiliones. Sitio web del Museo Nacional/Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. Disponible en: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.
- Machado, G. & Macías-Ordoñez, R. 2007. Reproduction. En: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds). *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge.
- Machado, G., Buzatto, B.A., García-Hernández, S. & Macías-Ordóñez, R. 2016. Macroecology of sexual selection: a predictive conceptual framework for large-scale variation in reproductive traits. *The American Naturalist* 188:S8-S27.
- Machado, G., Requena, G. S., Buzatto, B. A., Osses, F. & Rossetto, L. M. 2004. Few new cases of paternal care in harvestmen (Arachnida: Opiliones):

- implications for the evolution of male guarding in the Neotropical family Gonyleptidae. *Sociobiology*, 44:577-598.
- Machado, G., Requena, G.S., Toscano-Gadea, C., Stanley, E. & Macías-Ordóñez, R. 2015. Male and female mate choice in harvestmen: general patterns and inferences on the underlying processes. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). *Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Macías-Ordóñez, R., Machado, G., Pérez-González, A. y Shultz, J.W. 2010. Genitalic evolution in Opiliones. En: Leonard, J. & Cordoba-Aguilar, A. (eds) *The evolution of primary sexual characters in animals*. Oxford University Press, Oxford.
- Manning, A. 1967. The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Animal Behaviour* 15:239–250.
- Martens, J. 1969. Die Sekretarbitung während des Paarungsverhaltens von *Ischyropsalis* C. L. Koch (Opiliones). *Zeitschrift Fur Tierpsychologie* 26:513–523.
- Martens, J., Hoheisel, U. & Götze, M. 1981. Vergleichende anatomie der legeröhren der Opiliones als beitrag zur phylogenie der ordnung (Arachnida). *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 105:13–76.
- Meijer, J. 1972. Some data on the phenology and the activity patterns of *Nemastoma lugubre* (Müller) and *Mitostoma chrysomelas* (Herman) (Nemastomatidae: Opilionida: Arachnida). *Netherland Journal of Zoology* 22:105–118.

- Møller, A.P. & Pomiankowski, A. 1993. Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32:167–176.
- Morrow, E.H. 2004. How the sperm lost its tale: the evolution of aflagellate sperm. *Biological Reviews* 79:795–814.
- Nazareth, T.M. & Machado, G. 2009. Reproductive behavior of *Chavesincola inexplicabilis* (Opiliones, Gonyleptidae) with description of a new and independently evolved case of paternal care in harvestmen. *Journal of Arachnology*, 37:127–134.
- Nazareth, T.M. & Machado, G. 2010. Mating system and exclusive postzygotic paternal care in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones). *Animal Behaviour* 79:547–554.
- Pabst, W. 1953. Zur Biologie der mitteleuropäischen Trogliden. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere* 82:1–156.
- Parker, G.A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences. *Biological Reviews* 45:525–567.
- Peretti, A.V. & Aisenberg, A. 2015. *Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Peretti, A.V. & Eberhard, W.G. 2009. Cryptic female choice via sperm dumping favours male copulatory courtship in a spider. *Journal of Evolutionary Biology* 23:271–281.
- Peretti, A., Eberhard, W.G. & Briceño, R.D. 2006. Copulatory dialogue: female spiders sing during copulation to influence male genitalic movements. *Animal Behaviour* 72:413–421.

- Polak, M. & Rashed, A. 2009. Microscale laser surgery reveals adaptive function of male intromittent genitalia. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 277:1372–1376.
- R Core Team. 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- Requena, G.S. & Machado, G. 2014. Mating behavior of a Neotropical arachnid with exclusive paternal care. *Acta Ethologica* 17:23–30.
- Requena, G.S. & Machado, G. 2015. Effects of egg attendance on male mating success in a harvestman with exclusive paternal care. *Behavioural Ecology* 26:926–935.
- Requena, G.S., Buzatto, B.A., Martins, E.G. & Machado, G. 2012. Paternal care decreases foraging activity and body condition, but does not impose survival costs to caring males in a neotropical arachnid. *PLoS ONE* 7:e46701.
- Rodriguez, R.L. 2015. Mating is a give-and-take of influence and communication between the sexes. En: Peretti, A.V. & Aisenberg, A. (eds). *Cryptic female choice in arthropods: patterns, mechanisms and prospects*. Springer, Nueva York.
- Santos, F.H. 2007. *Ecophysiology*. En: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds). *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge.
- Schielezeth, H. 2010. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients. *Methods in Ecology and Evolution* 1:103–113.
- Schneider, J.M., Gilberg, S., Fromhage, L. & Uhl, G. 2006. Sexual conflict over copulation duration in a cannibalistic spider. *Animal Behaviour* 71:781–788.

- Shultz, J.W. & Pinto-da-Rocha, R. 2007. Morphology and functional anatomy. En: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds). *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge.
- Shultz, J.W. & Regier, J.C. 2001. Phylogenetic analysis of Phalangida (Arachnida, Opiliones) using two nuclear protein-encoding genes supports monophyly of Palpatores. *Journal of Arachnology* 29:189–200.
- Shuster, S.M. & Wade, M.J. 2003. *Mating systems and strategies*. Princeton University Press, Princeton.
- Simmons, L.W. 2001. *Sperm competitions and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press, Princeton.
- Snook, R.R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution* 20:46–53.
- Snow, L.S. & Andrade, M.C. 2004. Pattern of sperm transfer in redback spiders: implications for sperm competition and male sacrifice. *Behavioural Ecology* 15:785–792.
- Snow, L.S.E. & Andrade, M.C. 2005. Multiple sperm storage organs facilitate female control of paternity. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 272:1139-1144.
- Sullivan-Beckers, L. & Hebets, E.A. 2014. Tactical adjustment of signaling leads to increased mating success and survival. *Animal Behaviour* 93:111–117.
- Stafstrom, J.A. & Hebets, E.A. 2013. Female mate choice for multimodal courtship and importance of the signaling background for selection on male ornamentation. *Current Zoology* 59:200–209.
- Stanley, E. 2011. Egg hiding in four harvestman species from Uruguay (Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Arachnology* 39:495–496.

- Stanley, E. 2012. Comportamiento sexual y estrategias reproductoras en *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae). Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay, 54 p.
- Stanley, E., Francescoli, G. & Toscano-Gadea, C.A. (2016). Mating behavior of the solitary harvestman *Pachyloides thorellii* (Arachnida: Opiliones) *Journal of Arachnology* 44:210–217.
- Takami, Y. 2003. Experimental analysis of the effect of genital morphology on insemination success in the ground beetle *Carabus insulicola* (Coleoptera Carabidae). *Ethology, Ecology and Evolution* 15:51–61.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist* 122:765–788.
- Toscano-Gadea, C.A. & Simó M. 2004. La fauna de opiliones en un área costera del Río de la Plata (Uruguay). *Revista Ibérica de Aracnología* 10:157–162.
- Uetz, G.W., McClintock, W.J., Miller, D., Smith, E.I. & Cook, K.K. 1996. Limb regeneration and subsequent asymmetry in a male secondary sexual character influences sexual selection in wolf spiders. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 38:253–257.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. 2002. *Modern applied statistics*. Springer, Nueva York.
- Willemart, R.H., Farine, J.P. & Gnaspini, P. 2009. Sensory biology of Phalangida harvestmen (Arachnida, Opiliones): a review, with new morphological data on 18 species. *Acta Zoologica* 90:209–227.
- Willemart, R.H., Farine, J.P., Peretti, A.V. & Gnaspini, P. 2006. Behavioral roles of the sexually dimorphic structures in the male harvestman *Phalangium opilio* (Opiliones, Phalangidae). *Canadian Journal of Zoology* 84:1763–1774.

- Willemart, R.H., F. Osses, M.C. Chelini, Macías-Ordóñez & Machado, G. 2008. Sexually dimorphic legs in a neotropical harvestman (Arachnida, Opiliones): Ornament or weapon? *Behavioral Processes* 80:51–59.
- Wulff, N.C., van de Kamp, T., dos Santos Rolo, T., Baumbach, T. & Lehmann G.U.C. 2017. Copulatory courtship by internal genitalia in bushcrickets. *Scientific Reports* 7:42345.
- Zahavi, A. & Zahavi, A. 1997. *The handicap principle: a missing piece of Darwin's puzzle*. Oxford University Press, New York.
- Zatz, C., Werneck, R.M., Macías-Ordóñez, R. & Machado, G. 2011. Alternative mating tactics in dimorphic males of the harvestman *Longiperna concolor* (Arachnida: Opiliones). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 65:995–1005.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A. & Smith, G.M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, Nueva York.

ANEXO

Resúmenes presentados en jornadas y congresos

Efecto del cortejo en el éxito de cópula del opilión *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae)

E. Stanley¹, G. Machado², C.A. Toscano-Gadea¹ y A. Aisenberg¹

¹Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Ecología, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

En muchas especies, los machos exhiben cortejo pre- y post-copulatorio. El efecto del cortejo sobre el éxito reproductivo se puede evidenciar a través de experimentos que modifiquen las estructuras responsables de estos comportamientos. Los machos del opilión *Pachyloides thorellii* realizan un intenso cortejo, en el que se observan toques con patas I sobre el dorso de la hembra antes, durante y luego de la cópula. El objetivo del trabajo fue determinar la importancia del cortejo en el éxito de cópula en *P. thorellii*. Creamos dos grupos experimentales: 'Machos Tratados' (MT), con la capacidad de cortejar limitada por una tira de cinta de papel pegando una de sus patas I al dorso y 'Hembras Tratadas' (HT), con percepción del cortejo limitada por medio de una porción de cerámica fría adherida al dorso. Ambos tratamientos son reversibles sin dañar al animal. Cada pareja fue enfrentada en dos oportunidades, una con uno de sus integrantes bajo tratamiento según perteneciera a MT o HT y otra donde ambos individuos libres de tratamiento (Control) sin tratamiento. Filmamos bajo luz roja cada experiencia y cuantificamos la ocurrencia de cortejo y cópula. Se registraron hasta el momento 20 cópulas: 14 con individuos libres y 6 con individuos bajo tratamiento. Encontramos que los individuos copulan con mayor frecuencia cuando pueden cortejar libremente (n=14) que bajo tratamiento (n=6) (MT vs Libres: $X^2=4,08$; $p=0,043$; HT vs Libres: $X^2=8,10$; $p=0,004$). Sin embargo, no hubieron diferencias en el número de cópulas observadas entre MT y HT (n=3 para ambos casos). Estos datos preliminares muestran la potencial importancia del cortejo en *P. thorellii*. Nos encontramos analizando en detalle el cortejo y cópula buscando si existe relación entre comportamientos desplegados por el

macho y/o la hembra y el éxito de cópula en esta especie. Apoyo: ANII POS_NAC_2014_1_102665.

PRESENTADO EN: V Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal

MODALIDAD: Poster

=====

Sistemas de apareamiento en opiliones: historia de una pasión

Stanley, E.¹; Machado, G.²; Aisenberg, A.¹

¹Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Ecología. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

Los Opiliones son arácnidos que se diferencian de los otros órdenes por presentar cópula directa. Los machos presentan un órgano intromitente (pene) con el cual transfieren el esperma directamente al tracto reproductivo de las hembras. Estudios previos en especies Neotropicales muestran que tanto machos como hembras pueden aparearse más de una vez por período reproductivo. Este hecho da lugar a procesos de selección no solo previos a la cópula sino posteriores e internos como la competencia espermática y la elección críptica femenina. Para lograr el éxito reproductivo, tanto machos como hembras presentan diversas estrategias comportamentales que van desde un cortejo intenso con los primeros pares de patas antes, durante y luego de la cópula, pasando por la entrega de sustancias durante la cópula, hasta la construcción y/o defensa de territorios valiosos al momento de la oviposición. La efectividad de dichas estrategias sólo pueden observarse realizando estudios que abarquen gran parte de la historia reproductiva de los individuos, desde el comportamiento a la transferencia de esperma. Sin embargo, hasta el momento este tipo de estudios son muy escasos en opiliones, sobre todo investigaciones que relacionen los comportamientos observados durante la cópula con el éxito reproductivo de cada individuo. Durante este simposio discutiremos si existe relación entre la intensidad y duración del cortejo con la aceptación y duración de la cópula, la transferencia de esperma y la cantidad de huevos maduros de la hembra al momento de la cópula. También se planteará cuál es el gasto de

esperma realizado por los machos en cada cópula. Para esto utilizaremos como modelo la especie nativa *Pachyloides thorellii*, manipulando experimentalmente el cortejo copulatorio del macho y la capacidad de sensor este cortejo en la hembra, cuantificando los comportamientos observados y esperma transferido durante las cópulas.

PRESENTADO EN: VI Congreso Uruguayo de Zoología

MODALIDAD: Simposio

=====

Serenata de contacto: Efecto del cortejo en el éxito de cópula en *Pachyloides thorellii* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae)

Estefanía Stanley¹, Glauco Machado² y Anita Aisenberg¹

¹Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, División en formación Ecología y Biología Evolutiva, IIBCE.

²Departamento de Ecología, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

En especies poliándricas el éxito reproductivo puede verse afectado por procesos postcopulatorios como la competencia espermática y/o elección criptica femenina. Evaluar el cortejo y las respuestas femeninas durante la cópula pueden permitir evidenciar y estimar la importancia de dichos procesos. Nos propusimos evaluar los efectos del cortejo en el éxito reproductivo y la transferencia espermática en el opilión, *Pachyloides thorellii*. Hipotetizamos que: (1) Existen comportamientos de cortejo masculino y de selectividad femenina durante la cópula; (2) El cortejo masculino aumenta la aceptación de la cópula; (3) Cortejos más intensos y cópulas más prolongadas permiten una mayor transferencia de esperma. Creamos dos grupos experimentales: 'Machos Tratados' (MT), con la capacidad de cortejar limitada y 'Hembras Tratadas' (HT), con la capacidad de percibir el cortejo masculino reducida. Enfrentamos cada pareja dos veces, una con uno de sus integrantes bajo tratamiento (MT o HT) y otra con ambos individuos libres de tratamiento (Control). Filmamos cada experiencia y cuantificamos la existencia y características del cortejo y cópula. Luego de las experiencias y de ocurrir cópula, realizamos conteo de esperma. Hasta el momento, encontramos ocho nuevos comportamientos que indicarían

inversión masculina en estimulación así como evaluación femenina durante y luego de la cópula. Las cópulas con individuos tratados fueron menos frecuentes que en el grupo Control (MT vs Control: $X^2=16,96$, $p<0,001$; HT vs Control: $X^2=23,04$, $p<0,001$). Encontramos además que las hembras con cópulas más prolongadas almacenaron mayor cantidad de esperma ($F=5,9$, $R=0,396$, $b=0,506$, $p=0,033$). Si bien son resultados preliminares, observamos tanto la presencia de estrategias de elección femenina como de estimulación masculina durante la cópula. Este es el primer estudio en el que se utilizan hembras vírgenes, se cuantifica cortejo copulatorio y transferencia espermática en opiliones, poniendo a punto por primera vez para este orden técnicas y protocolos para conteo de esperma utilizadas en otros arácnidos. Financiación: ANII POS_NAC_2014_1_102665

PRESENTADO EN: Primeras Jornadas de Investigación Científica “Profesor Clemente Estable”

MODALIDAD: Poster

=====

Dialogando, ¿se llega al éxito?: Interacción macho-hembra durante la cópula en *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae)

Estefanía Stanley*: Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, División en formación Ecología y Biología Evolutiva, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

Glauco Machado: Departamento de Ecología, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

Anita Aisenberg: Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, División en formación Ecología y Biología Evolutiva, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

En muchas especies, la interacción macho-hembra durante el comportamiento sexual pasa por etapas pre-copulatorias, copulatorias y post-copulatorias. En especies poliándricas, el éxito reproductivo puede verse afectado por procesos que ocurren en etapas post-copulatorias (competencia espermática y/o elección críptica femenina) y el intercambio de señales durante y luego de la cópula. Nos propusimos estudiar en detalle las interacciones sexuales macho-hembra del opilión *Pachyloides thorellii*. Enfrentamos machos y hembras adultos vírgenes,

filmamos cada experiencia y cuantificamos la existencia y características del cortejo y cópula. Observamos 21 cópulas y encontramos nuevos comportamientos que podrían indicar cortejo copulatorio masculino y evaluación femenina durante y luego de la cópula. Observamos que la hembra presenta comportamientos (evertir la boca y abrir la tapa del opérculo genital) con los que muestra su predisposición a iniciar la cópula y coopera con el macho facilitándola. Durante la cópula, observamos que los machos, además del cortejo copulatorio táctil propio del grupo, realizan vibraciones genitales durante la inserción y colocan la vaina del pene en contacto con la boca de la hembra. Encontramos que cuando el macho no realiza todos estos comportamientos simultáneamente, la hembra tira de la sujeción y/o baja el cuerpo, y el macho tiende a completar el cortejo hasta realizar todos los comportamientos mencionados. Los resultados sugieren que, durante la cópula, la hembra despliega comportamientos que llevan al macho a modificar su cortejo. Estudios futuros intentarán discriminar si estos comportamientos funcionan como señales copulatorias intersexuales y cuál es su efecto sobre el éxito reproductivo en esta especie.

PRESENTADO EN: V Congreso Latinoamericano de Aracnología

MODALIDAD: Poster