



Informe de Pasantía para optar al Título de Licenciado en Ciencias Biológicas, Opción Etología.

DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL Y LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS DEL OPILIÓN NEOTROPICAL *Acanthopachylus aculeatus* (KIRBY, 1818) (OPILIONES, GONYLEPTIDAE).



JORGE ALEXANDER LEMOS-PERDOMO

Orientador: Dr. Gabriel Francescoli

Co-orientador: Inv. Carlos A. Toscano-Gadea

Montevideo, Uruguay

2024

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	12
HIPÓTESIS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN.....	25
Agradecimientos	30
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

Los Opiliones son un Orden de arácnidos que posee características únicas. Muestran una gran tolerancia a otros co-específicos, siendo capaces de formar grandes agregaciones y poseen la capacidad de secretar sustancias químicas. Su segundo par de patas casi no se utiliza en la locomoción sino que cumple un rol sensitivo y, quizás la más importante, son los únicos arácnidos donde la transferencia espermática es directa. Los machos poseen un verdadero pene, variable en longitud y forma, que es introducido dentro del orificio genital de la hembra. Es esta característica única, además de las variadas estrategias reproductivas, las que transforman a los Opiliones en excelentes modelos para estudios de selección sexual.

Tradicionalmente en Uruguay los estudios que involucran a este Orden estaban relacionados con aspectos sistemáticos y biológicos, pero poco sabíamos del comportamiento sexual y las estrategias reproductivas. Solo recientemente se ha comenzado a profundizar esta temática, es por ello que el objetivo de este trabajo es describir en detalle, por primera vez en una especie gregaria, el comportamiento reproductivo de *Acanthopachylus aculeatus* (Kirby 1818), un Gonyleptidae muy común en el sur de Uruguay.

Acanthopachylus aculeatus presentó un comportamiento reproductivo similar al observado en otros Gonyleptidae, aunque los machos presentaron comportamientos no descritos anteriormente. Entre estos se destacan las flexiones de las patas IV durante la cópula, luego de que el pene haya ingresado en el orificio genital femenino. Estas flexiones pueden ser muy intensas, empujando a la pareja durante la cópula. Asimismo, los machos de *A. aculeatus*, son capaces de cortejar y copular a otras hembras inmediatamente después de haber finalizado una copula previa.

Las hembras también presentaron comportamientos novedosos, rechazando a machos cortejante girando completamente su cuerpo.

A diferencia de lo observado en otras especies de Gonyleptidae, tanto machos como hembras de *A. aculeatus* permanecen menos tiempo juntos una vez finalizada la cópula. Esto podría estar relacionado con el gregarismo que la especie posee y la disponibilidad de parejas sexuales que ello implica. Nuestros resultados sugieren que la estrategia reproductiva de *A. aculeatus* es la poliginandria, común en varias especies de Gonyleptidae.

Palabras clave: Estrategia reproductiva, Cortejo pre-copulatorio, Cortejo copulatorio, gregarismo, Opiliones.

INTRODUCCIÓN

La selección natural es el proceso propuesto por Darwin para explicar la supervivencia de los organismos mejor adaptados, o sea, aquellos organismos que poseen una serie de características capaces de aumentar la eficacia en la fertilización y/o supervivencia de su descendencia. Pero también Darwin (1871) observó que algunas de estas características parecían ser contrarias a la selección natural, ya que exponían a esos organismos a riesgos de predación y gastos energéticos mayores a los esperados por este proceso.

Estas características sobresalientes (o “rasgos exagerados” en las palabras de Darwin), se encuentran preponderantemente, aunque no exclusivamente, en los machos: olores estimulantes, llamativas exhibiciones de características físicas, cantos, explosiones de colores brillantes, sinfonías de sonidos y/o regalos, grandes cornamentas utilizadas para combatir con machos rivales y cortejar a las hembras. Darwin sostenía que estos rasgos no surgen de una lucha por la existencia en relación con otros seres orgánicos o por condiciones externas, sino de una lucha entre los individuos de la misma especie y sexo, generalmente los machos, por la oportunidad de aparearse con el otro sexo.

La selección sexual es entonces, un concepto clave a la hora de abordar y responder interrogantes sobre la selección natural. Este proceso fue definido por Darwin (1871) como aquellos mecanismos anatómicos, fisiológicos y comportamentales que modelan lo que ocurre antes o simultáneamente al apareamiento y que son útiles para la obtención de un compañero, ocurriendo de formas distintas tanto en machos como en hembras. La selección sexual entonces no depende de la lucha por la existencia, como la selección natural, sino de la lucha de los machos por obtención de pareja (Ghiselin 2010).

La reproducción sexual implica la presencia de machos y hembras, y supone la formación de gametos por meiosis y la fusión del material génico proveniente de ambos progenitores. Mientras las hembras producen gametos grandes, inmóviles y ricos en nutrientes -óvulos-, los machos producen gametos pequeños, casi sin nutrientes y móviles -espermatozoides- (Parker et al. 1972). La asimetría en el

tamaño de los gametos o anisogamia (Patriquin et al. 2010), supone un gasto muy superior de las hembras en comparación con la de los machos, además de que las hembras suelen ser las que presentan una mayor inversión parental en las crías (Andersson 1994).

Esta desigual inversión en materia de reproducción entre ambos sexos explica entonces que, si un sexo invierte considerablemente más que otro, los miembros del sexo que menos invierte competirán entre ellos para aparearse con los miembros del otro (Trivers 1972). Siendo entonces las hembras quienes poseen un número limitado de gametos y realizan mayoritariamente un mayor esfuerzo reproductivo, constituyen entonces un recurso (reproductivo) escaso y por ello resultan ser selectivas a la hora de escoger pareja (Elgar 1998). Esto hace que los machos fueran quienes se encuentren bajo presión para ser buenos encontrando, cortejando y compitiendo por acceder a ellas, maximizando su éxito reproductivo al conseguir la mayor cantidad de apareamientos posibles (Bateman 1948; Trivers 1972; Emlen y Oring, 1977; Andersson 1994; Elgar 1998).

El éxito diferencial de los individuos al momento de acceder a las hembras se traducirá en la evolución de caracteres morfológicos o comportamentales, que son preferidas por las hembras aumentando así su tasa de apareamiento (Krebs y Davies 1993; Andersson 1994; Cotton et al. 2006). Estos caracteres confieren a los machos una ventaja selectiva, permitiendo que la hembra pueda reconocerlo y de esta forma estimular el apareamiento. El límite de estos caracteres exagerados está dado por la selección natural, la cual limita la sobrevivencia a quien los porte (Tinbergen 1964).

Las presiones selectivas varían según los distintos sistemas de apareamiento. La monogamia es un sistema de apareamiento en el cual macho y hembra se aparean exclusivamente entre ellos, al menos durante una estación reproductiva. La monogamia ocurriría cuando los machos no pueden monopolizar hembras o recursos; cuando no obtienen beneficios reproductivos extra copulando con varias hembras, o cuando la probabilidad de sacar adelante las crías es mayor con ayuda de ambos padres y los machos pueden aportar a dichos cuidados (Carranza 1994).

La poligamia ocurre cuando un individuo se reproduce con varios individuos del sexo opuesto, en un mismo período reproductor. Este sistema de apareamiento se divide en dos: a) poliginia: un macho se aparea con dos o más hembras y b) poliandria: una hembra se aparea con dos o más machos. Una variante de las opciones anteriores es la poliginandria, donde dos o más machos se aparean con dos o más hembras y vice versa. (Orians 1969; Emlen y Oring 1977; Carranza 1994).

A diferencia de lo propuesto por Darwin, actualmente se piensa que estos mecanismos no están restringidos al cortejo, sino que pueden extenderse durante y después de la cópula (Parker 1970; 1974).

Posteriormente, Thornhill (1983) y Eberhard (1985; 1996) proponen el concepto de elección criptica femenina como una forma de selección intersexual luego de la cópula. En este caso, la hembra podría evaluar al macho no solo durante el cortejo sino también durante y luego de la cópula. Aquel macho que mejor se desempeñara durante estos comportamientos, y/o presentara determinadas características fisiológicas, podría ser favorecido y favorecería su paternidad (Eberhard 1996).

Todo acto reproductivo, supone costos y beneficios para ambos sexos y existe un balance en términos energéticos para un organismo, en cuanto a tener la posibilidad de una mayor expectativa de vida aplicando muy poco gasto en términos reproductivos o invertir todas sus reservas perpetuando su descendencia a la siguiente generación y por ende disminuyendo su longevidad (Carranza 1994).

Considerando esto, no parece extraño que los machos tengan la tendencia a aparearse con más de una hembra, pero el caso contrario no resulta tan obvio. El aumento en el número de apareamientos en las hembras posee desventajas: incrementan el costo de producción de gametos, la posibilidad de predación y la transmisión de enfermedades y/o eventuales daños físicos disminuyen el tiempo dispuesto para alimentarse (Parker 1984; Eberhard 1985; 1996; Arnqvist y Nilsson 2000; Huber 2005). Sin embargo, el incremento en el número de apareamientos también posee ventajas: aumento en la tasa reproductiva, mitiga el efecto de una cópula con un macho estéril o incompatible genéticamente, mantiene el esperma

viable por mayor cantidad de tiempo y aumenta la diversidad genética de las crías, lo que permitiría una mejor adaptación a cambios ambientales (Austad 1984; Alcock 1994; Arnqvist y Nilsson 2000; Elgar 2005; Simmons 2001; 2005).

La Clase Arachnida está conformada por 11 Órdenes, de los cuales los Opiliones Sundevall 1883, con aproximadamente 6.534 especies, son el tercero en diversidad de especies (Kury 2013). Los Opiliones están presentes en todos los continentes excepto la Antártida y se clasifican en cuatro Subórdenes: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi y Laniatores (Shultz 2007), éstos dos últimos presentes en Uruguay. El Suborden Laniatores, Thorell 1876, con unas 4.183 especies, es el de mayor diversidad específica y posee una distribución que abarca regiones tropicales y subtropicales del hemisferio sur (Giribet et al. 1999; 2002; Shultz y Regier 2000; Kury 2013).

Los opiliones poseen hábitos nocturnos y crepusculares, manteniéndose refugiados durante el día en ambientes criptozóicos como piedras, troncos y hojarasca (Curtis y Machado 2007). Los factores bióticos, como la temperatura y la humedad, son muy importantes para su distribución, ya que no son eficientes en evitar la pérdida de agua (Santos 2007). Son omnívoros, alimentándose de materia en descomposición, plantas y hongos, aunque son capaces de capturar pequeñas presas como termitas o larvas de insectos (Acosta y Machado 2007). Una particularidad del grupo, que lo diferencia de otros grupos de arácnidos, es que muchas especies parecen ser muy tolerantes a la presencia de coespecíficos, siendo capaces de formar densas agregaciones durante el día. Dentro del suborden Eupnoi se han encontrado agregaciones de hasta 70.000 individuos y en el suborden Laniatores encontramos especies que forman agregaciones que van desde 3 a 200 individuos (Coddington et al. 1990).

Otra diferencia de este grupo en comparación con el resto de los Arácnidos, es la capacidad de secretar sustancias químicas. Estas sustancias se encuentran en un par de glándulas denominadas “repugnatorías” ubicadas a los costados o sobre el cuerpo. La secreción de estas sustancias podría tener la función de barrera defensiva contra potenciales predadores (Gnaspini y Hara 2007). Finalmente, la función del segundo par de patas es único de este Orden. El segundo par de patas

cumple funciones sensitivas y casi no interviene en la locomoción (Willemart y Chelini 2007).

Más allá de las diferencias comentadas anteriormente, quizás la más importante está relacionada con su biología reproductiva. La transferencia espermática ocurre en forma directa, siendo esta estrategia única entre los arácnidos. Los machos poseen un verdadero órgano intromisor, denominado “pene”, el cual es introducido dentro del ovopositor de la hembra (Machado y Macías-Ordóñez 2007). El pene posee forma cilíndrica, está cubierto por músculos y, en algunos grupos, presenta una alta complejidad de ornamentaciones en el extremo, las cuales sirven como caracteres para identificar especies. La transferencia espermática se realiza en forma directa al interior de la hembra, salvo en algunas pocas especies, pertenecientes al Suborden Cyphophthalmi, donde existen registros de que poseen transferencia espermática a través de espermatóforos, los cuales poseen forma de bolsa, carácter ancestral dentro del Orden. También se han reportado algunos casos de reproducción asexual, por medio de partenogénesis (Machado y Macías-Ordóñez 2007).

El ovipositor femenino es también una estructura cilíndrica, que varía en el largo, según el Suborden: en el Suborden Eupnoi los ovipositores son altamente sensitivos y largos, utilizados para seleccionar un lugar protegido y adecuado para depositar sus huevos (Edgar 1971). Mientras, en los Subordenes Dyspnoi y Laniatores, las hembras presentan ovipositores más cortos, robustos y con menor cantidad de órganos sensitivos (Machado y Macías-Ordóñez 2007). La hembra deposita los huevos posteriormente de haber copulado en forma individual o en forma agregada, pudiendo, o no existir cuidado de la puesta por parte de la hembra, del macho o de ambos (Machado et al. 2015).

Estudios realizados en la última década, han demostrado que los opiliones son excelentes modelos para estudios de selección sexual, presentando estrategias reproductivas muy variadas (Buzzato y Machado 2008; Buzzato et al. 2011; Machado et al. 2009). En nuestro país este tipo de estudios son incipientes, Stanley (2012; 2018), Stanley et al. (2016; 2023) realizaron la descripción detallada del comportamiento sexual y las estrategias reproductivas del opilión solitario

Pachyloides thorelli Holmberg 1878, un Gonyleptidae de pequeño tamaño que vive en ambientes naturales y modificados del sur del país. Asimismo, Stanley y Toscano-Gadea (2011a) y Fernández et al. (2017) lo hicieron sobre *Opisthoplatus prospicuus* (anteriormente *Discocyrtus prospicuus*) (Holmberg 1876), otro Gonyleptidae con características similares y finalmente, Stanley y Toscano-Gadea (2011b) realizaron estudios piloto sobre el comportamiento sexual de *Acanthopachylus aculeatus* (Kirby 1818), también perteneciente a la familia Gonyleptidae, endémica de las Américas y una de las más diversas a nivel específico, con aproximadamente 820 especies conocidas hasta el momento, de las cuales nueve se encuentran presentes en nuestro país (Kury 2013; Pinto-da-Rocha y Giribet 2007; Giuliani 2008).

Acanthopachylus aculeatus (Figs. 1 y 2) es una de las especies de mayor tamaño de nuestro país (entre 1- 1,5 cm de largo corporal) y la más abundante. Su cuerpo posee coloración marrón verdosa, con dos líneas amarillas que rodean los costados del cuerpo. Los machos tienen un tamaño mayor que las hembras, una fuerte espinación en coxas y fémures de patas IV y área V del cuerpo. En nuestro país se distribuye, tanto en áreas naturales como modificadas, formando agregaciones numerosas de más de 50 individuos (Toscano-Gadea com. pers.) (Fig. 3). Además de Uruguay, su presencia ha sido reportada para Argentina, Brasil y Paraguay (Capocasale y Gudynas 1993; Kury 2003; Toscano-Gadea y Simo, 2004; Perrone 2016; Acosta 2021).

Dada la capacidad de esta especie de formar agregaciones numerosas y considerando su limitada capacidad de dispersión (Acosta 2002; Perrone 2016), es de suponer que la probabilidad de encontrarse con varios individuos -e inclusive con el mismo- en una o en varias oportunidades durante un mismo período reproductivo, sea alta. Es por ello que nos propusimos describir el comportamiento sexual de *A. aculeatus* y determinar cuáles son sus estrategias reproductivas.

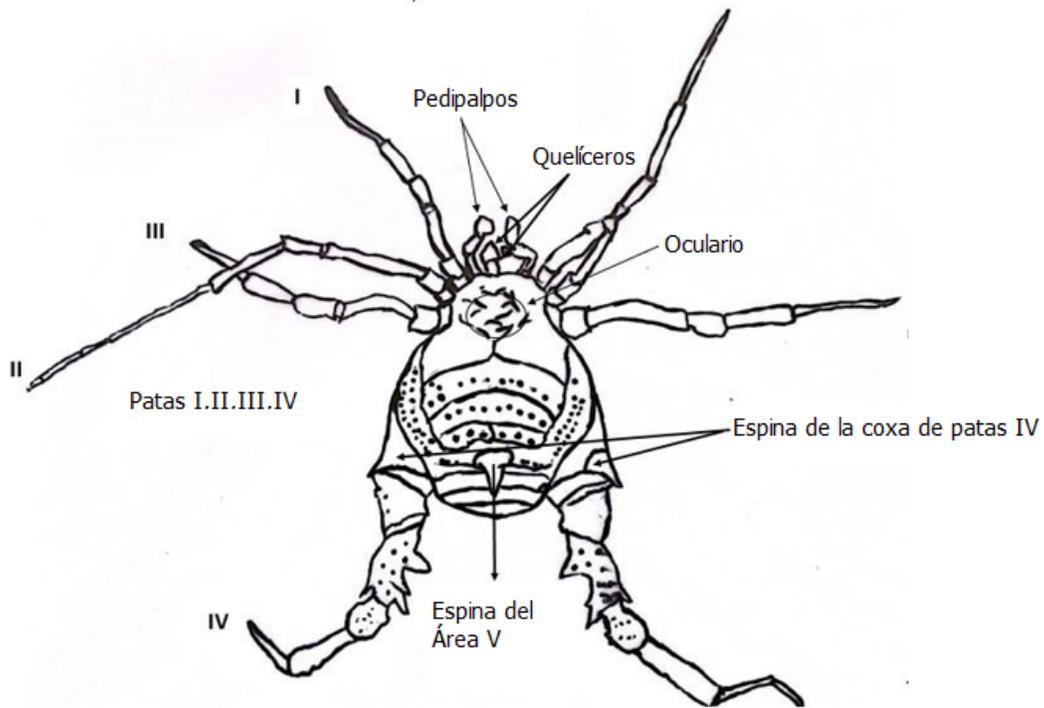


Fig 1: Esquema representativo de las partes de un opilión (Tomado de una foto).



Fig. 2: Hembra (izquierda) y macho (derecha) de *Acanthopachylus aculeatus*, La línea indica 1cm (Foto: Carlos A. Toscano-Gadea).



Fig. 3 Agregación de distintos ejemplares de *Acanthopachylus aculeatus* en Punta Gorda, Departamento de Montevideo. (Foto: Carlos A. Toscano-Gadea).

OBJETIVOS

- 1) Describir, por primera vez, el comportamiento sexual de *Acanthopachylus aculeatus* (Kirby 1818).
- 2) Determinar qué estrategia reproductiva posee *Acanthopachylus aculeatus*, considerando las características gregarias de la especie.

HIPÓTESIS

- 1) Las interacciones entre machos y hembras antes, durante y luego de la cópula se enmarcan dentro del cortejo pre-copulatorio, copulatorio y post-copulatorio respectivamente.

- 2) Dada la existencia de agregaciones, es de esperar que las posibilidades de encuentro de parejas sean altas, por lo cual la estrategia de apareamiento de *A. aculeatus*, que se ajusta a su historia de vida, es la Poliginandria (machos y hembras copulan con distintas parejas sexuales a lo largo de una temporada reproductiva).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplares juveniles de *A. aculeatus* fueron colectados en Punta Gorda, Departamento de Montevideo (34°53'56.76"S, 56°04'47.45"O) y Piedras de Afilar (34°45'42.32"S, 55°33'11.45"O), Departamento de Canelones (Fig. 4), entre setiembre y octubre del 2019. En ambos casos las colectas se realizaron en forma manual, revisando ambientes criptozóicos tales como piedras y troncos caídos.



Fig. 4: Lugares de colecta de ejemplares: Punta Carretas (Montevideo) y Piedras de Afilan (Canelones) (Foto Google Earth).

Los ejemplares colectados fueron trasladados al Laboratorio del Departamento de Ecología y Biología Evolutiva del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y se mantuvieron juntos hasta la muda de adultez. Este proceso resulta fundamental para determinar la historia reproductiva de los ejemplares utilizados.

La temperatura durante el periodo de cría fue de $22,9^{\circ}\text{C} \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ ($26,5^{\circ}\text{C} - 19,5^{\circ}\text{C}$) y la humedad fue de $60,65\% \pm 1.7\%$ (rango: $85\% - 44\%$). Una vez realizada la muda de maduración, machos y hembras fueron separados a los efectos de trabajar con ejemplares vírgenes. Todos los individuos fueron marcados en distintas zonas del cuerpo a los efectos de mantener la individualidad. Las marcas se realizaron con corrector de escritura de color blanco en base acuosa (BIC) el cual

de acuerdo con Perrone (2016) no afecta a los individuos. Estos ejemplares fueron colocados en recipientes de 25 cm de ancho, 25 cm de largo y 35 cm de alto, con tierra como sustrato, restos vegetales, cortezas y piedras como refugio, buscando imitar el hábitat natural de la especie, y un recipiente circular con algodón humedecido en agua como bebedero y fuente de humedad. Todas las experiencias fueron realizadas durante los meses de Mayo a Abril, entre las 18 y las 24hs en ausencia total de luz (para evitar interferencias en el comportamiento de los opiliones, los cuales son activos exclusivamente durante la noche). La temperatura durante el periodo de las experiencias, para ambos objetivos, fue de $25,0^{\circ}\text{C} \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ ($26.5^{\circ}\text{C} - 23^{\circ}\text{C}$) y la humedad fue de $56,9\% \pm 6,9\%$ (rango: 71% - 50%). Todas las experiencias fueron filmadas utilizando una cámara Sony DCR-SR40, con Night shot.

Semanalmente los individuos fueron alimentados *ad libitum* con trozos de pepino (*Cucumis sativus*) y zucchini (*Cucurbita pepo*); trozos de larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae), ejemplares muertos de *Musca domestica* (Muscidae) y alimento para perros (Primocao^R).

OBJETIVO 1: DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL.

Tres hembras vírgenes fueron colocadas entre 48 y 72 horas antes de comenzar las experiencias en un recipiente de vidrio de 15 cm de ancho por 15 cm de largo y 5 cm de altura, con arena como sustrato y un recipiente con algodón humedecido con agua para mantener la humedad. Inmediatamente antes de comenzar las experiencias un macho virgen fue colocado dentro del recipiente en el extremo más alejado con respecto a las hembras. Las experiencias se realizaron a partir de las 18 horas, evitando el ingreso de luz natural. Las mismas tuvieron una duración total de 60 minutos, y se tomaron notas de las interacciones observadas.

Una vez finalizada la experiencia, se marcó tanto al macho como a la hembra que copularon, en distintas partes del cuerpo con corrector blanco a base de agua de modo de identificarlas para ser utilizadas en el objetivo 2. Las marcas se realizaron en las patas III, IV y en el dorso del área V. Posteriormente, los individuos marcados fueron colocados en recipientes separados por sexo.

OBJETIVO 2: ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS.

Tres hembras copuladas y marcadas fueron colocadas en un recipiente de vidrio de 15 cm de ancho por 15 cm de largo y 5 cm de altura, con arena como sustrato y un recipiente con algodón humedecido con agua para mantener la humedad. Tal cual se describió anteriormente, las hembras se mantuvieron en el recipiente de experimentación entre 48 y 72 horas antes de las experiencias. Un macho que previamente había copulado en el objetivo 1 (marcado) con una de las tres hembras presente en la arena, fue colocado inmediatamente antes de comenzar las experiencias en el extremo más alejado respecto al cual se encontraban las hembras. De esta forma buscamos determinar si existe alguna preferencia en la elección del macho a volver a copular con la misma hembra o de la hembra a volver a copular con el mismo macho

Al igual que en objetivo 1, las experiencias se realizaron a partir de las 18 horas, evitando el ingreso de luz natural. Las mismas tuvieron una duración total de 60 minutos y se tomaron notas de las interacciones observadas.

Para ambos objetivos, todas las filmaciones se analizaron con el programa JWatcher Versión 0.9 (Blumstein et al. 2000) para determinar el número y duración de cada unidad comportamental. Los resultados fueron analizados con el programa PAST Versión 1.18 (Hammer et al. 2003) y con el programa STATISTICA Versión 8.0 (StatSoft 2007). Se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Si las variables mostraban normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizamos la prueba paramétrica t de Student; si no se cumplía alguna de estas condiciones, utilizamos la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Ejemplares de referencia serán depositados en la Colección Aracnológica de la Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

RESULTADOS

OBJETIVO 1: DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL.

Se realizaron 58 experiencias, de las cuales se obtuvieron 13 cópulas, con una duración promedio de 7.0 ± 4.8 min. (Rango: 12.6 - 4.1 min.) (Fig. 5). Durante las experiencias se observaron 16 unidades comportamentales, las cuales fueron definidas en la Tabla 1.

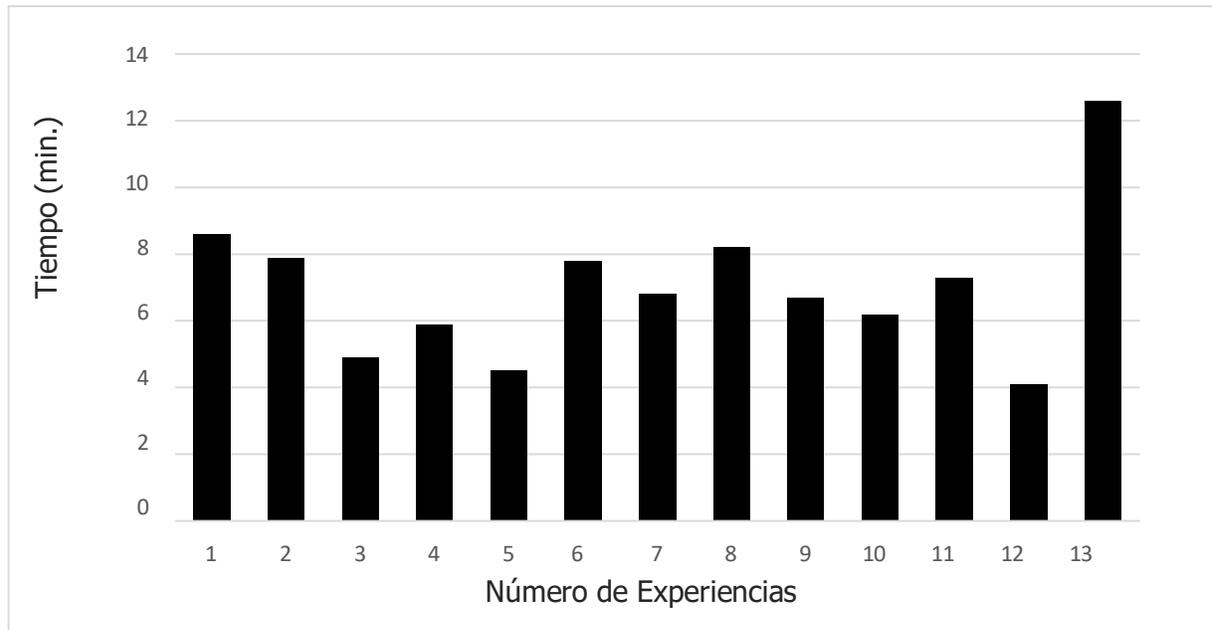


Figura 5. Duración del tiempo de cópula de *A. aculeatus*, observadas dentro del objetivo 1.

Tabla 1. Descripción de las unidades comportamentales observadas durante el comportamiento reproductivo de *A. aculeatus*.

	Unidad	Sexo	Descripción
1	Acercamiento	♂	Macho se acerca lentamente a la hembra con las patas II extendidas hacia ella.
2	Toques patas II	♂ ♀	Toques mutuos con el tarso del segundo par de patas, en distintas partes del cuerpo.
3	Toques patas I y II	♂ ♀	♂ realiza toques continuos y acelerados sobre dorso y patas de la hembra. La ♀ realiza toques lentos y discontinuos sobre el dorso del macho.
4	Macho sobre hembra	♂	♂ con pedipalpos extendidos, se impulsa con el IV par de patas, para ir sobre la ♀. Sin dejar de realizar toques con patas I y II se posiciona frente a la hembra.
5	Sujeción	♂	Una vez posicionado de frente a ♀, el ♂ sujeta los quelíceros de la ♀.
6	Desplazamiento	♂ ♀	Sujetos por los quelíceros, se desplazan por el sustrato.
7	Elevación	♂	♂ apoyado en el IV par de patas, eleva parte frontal de la ♀.
8	Inserción	♂ ♀	♂ extiende el pene hasta penetrar el orificio genital de la ♀.
9	Cortejo Copulatorio	♂	♂ con patas I, toca dorso y costados de la ♀, mientras que mantiene extendidas las patas II pudiendo tocar el cuerpo y patas de la ♀. Esta unidad inicia con la elevación de la hembra y finaliza con la separación de la pareja.
10	Tirones	♀	Apoyada sobre sus dos últimos pares de patas la hembra tira hacia atrás.
11	Movimiento de patas II	♀	La hembra balancea en el aire suavemente el segundo par de patas.
12	Flexiones	♂	El ♂ realiza una o más flexiones de sus patas IV, mientras desplaza a la ♀
13	Rechazo	♀	♀ intenta evitar la sujeción del macho. Extiende las patas I y III a los costados del cuerpo y eleva las patas IV inclinando la parte delantera del cuerpo. Asimismo, la ♀ puede extender lateralmente las patas I, III y IV apoyando completamente su cuerpo en el sustrato.

14	Separación	♂ ♀	Ambos sexos liberan sus quelíceros y se separan finalizando la cópula.
15	Limpieza de opérculo, patas y pedipalpos	♂ ♀	♀ raspa con las uñas de sus pedipalpos su opérculo. ♂ y ♀ frotan patas I, II y III entre sus quelíceros.
16	Alejamiento	♂ ♀	Uno o ambos individuos de la pareja se distancian uno del otro.

Durante el desarrollo de las experiencias cinco machos cortejaron y copularon con una segunda hembra virgen. Estas recópulas (denominadas *segundas cópulas*), fueron muy variables en duración: Tres machos tuvieron una cópula más larga en las segundas copulas que en las primeras, mientras que, dos machos copularon durante más tiempo en las primeras copulas que en las segundas (Fig. 6). A pesar de esta variación en la duración de las segunda cópulas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las primeras y las segundas cópulas observadas en este objetivo (5.4 ± 0.7 min; rango: 6.4 – 4.3 min.). En todos los casos donde se observaron estas segundas cópulas los machos lo hicieron con una hembra distinta con la que habían copulado previamente. La demora promedio entre la primera y la segunda cópula fue de 4.9 ± 5.2 min. (Rango: 1.3 – 13.7 min.) (Tabla 2).

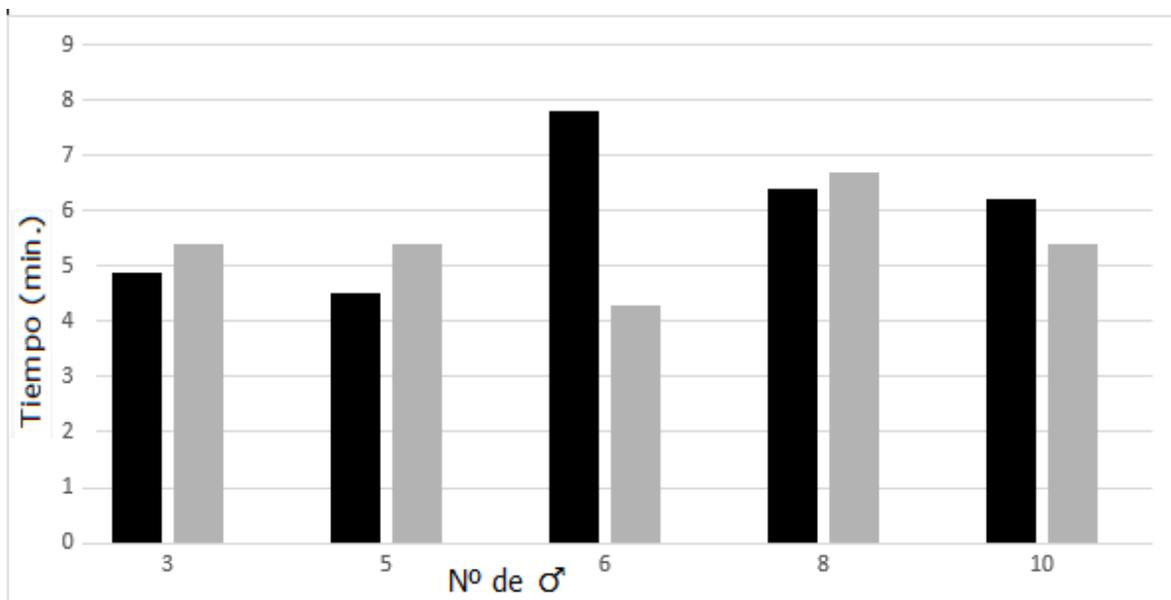


Figura 6. Detalle de la duración de las cópulas de los machos que copularon en dos oportunidades dentro del objetivo 1.

No se observó una diferencia estadísticamente significativamente al comparar la duración de las primera cópulas ($n = 13$) con las segundas cópulas ($n = 5$): $t = 1,63$; $p = 0.124$. Tampoco se observaron diferencias en los comportamientos de cortejo o cópula observados entre las primeras y las segundas cópulas.

Tabla 2. Duración y latencia, en minutos, entre las primeras y segundas cópulas de los machos de *A. aculeatus* que copularon dos veces durante el objetivo 1.

No. Macho	Duración primera cópula (min.)	Duración segunda cópula (min.)	Latencia entre cópulas (min.)
3	4,9	5,4	1,2
5	4,5	5,4	5,1
6	7,8	4,3	1,4
8	6,4	6,7	2,5
10	6,2	5,4	13,3

El comportamiento sexual de *A. aculeatus* comienza siempre con la aproximación del macho hacia la hembra, con sus patas II elevadas, extendidas y moviéndolas en dirección a donde se encuentra la hembra (Tabla 1). Una vez que ambos sexos se encuentran pueden tocarse con el tarso de las patas II (*Toques con patas II*), la hembra puede retirarse alejándose del macho o permanecer junto a él. Si la hembra se mantiene junto al macho, éste puede realizar una serie de toques rápidos y continuos sobre el dorso de la hembra utilizando las patas I y II, extender sus pedipalpos y finalmente flexionar sus patas IV y “lanzarse” sobre ella, sujetándola de cualquier parte del cuerpo (*Sujeción*). Este comportamiento se observó en el 69% de los casos durante las primeras cópulas, y en el 80% de los casos en las segundas. Las hembras pueden evitar que los machos las sujeten bajando la parte delantera del cuerpo; apoyando la cara ventral del cuerpo contra el sustrato; o girando el cuerpo lateralmente.

Una vez el macho se orienta frente a la hembra, la trae hacia él utilizando sus pedipalpos y sujetando con sus quelíceros los quelíceros de la hembra. Lograda la sujetación el macho flexiona las patas IV elevando a la hembra hasta formar un ángulo de aproximadamente 45° (Fig. 7). Si la hembra no accede a esta posición la cópula no se lleva a cabo. Durante este proceso el macho evierte el pene y, usando su primer par de patas, realiza rápidos toques sobre el dorso, el costado del cuerpo y las patas de la hembra. Al mismo tiempo mantiene el segundo par de patas extendido y elevado tocando el cuerpo de la hembra (*Cortejo copulatorio*). Estos toques con las patas I y II, disminuyen su intensidad a medida que la cópula avanza. A partir de la flexión del último par de patas, los machos pueden realizar una serie de movimientos bruscos que parecen empujar y/o atraer a la hembra hacia él (*Flexiones*). La ocurrencia de este comportamiento fue superior en las segundas cópulas (N=4; 80% de los casos) que en las primeras cópulas (N=6; 46%).



Fig. 7: Posición copulatoria de *A. aculeatus*. (imagen tomada de video con Nightshot[®]). La flecha de color rojo representa la ubicación del pene.

Durante las experiencias se observó la interacción de otras hembras con la pareja en cópula. Estas interacciones consistieron en acercarse a la pareja, tanto al macho como a la hembra con patas II y I, subirse e incluso, pasar por debajo de ellos. En ningún caso se observó que este comportamiento incidiera en la separación de la pareja.

La finalización de la cópula (*Separación*) puede darse porque el macho retira sus pedipalpos y libera los quelíceros de la hembra (38.5% en las primeras cópulas y 20% en las segundas cópulas), porque la hembra intenta bajar su cuerpo forzando al macho a liberarla, y/o realiza una serie de movimientos hacia atrás, tirando del macho hasta que este suelta la sujeción de los quelíceros (31% en las primeras cópulas y 60% en las segundas cópulas) o porque ambos se separan (30.5% en las primeras cópulas y 20% en las segundas cópulas). Una vez finalizada la cópula, ambos sexos pasan sus patas I, II y, eventualmente el III par, entre sus quelíceros. Mientras esto ocurre el macho puede quedarse junto a la hembra moviendo lentamente las patas II o alejarse de ella. Además, las hembras pasan los pedipalpos sobre el opérculo para posteriormente llevarlos a la boca (77% en las primeras cópulas y 100% en las segundas cópulas). Durante las primeras cópulas,

comportamientos desarrollados por los machos, los negros los desarrollados por las hembras y los grises por ambos sexos.

OBJETIVO 2: ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS DE *A. aculeatus*.

En este objetivo, realizamos un total de 7 experiencias, obteniendo cinco cópulas, con una duración promedio de 6.2 ± 1.4 min (Rango: 7.9 - 4.9 min) (Fig. 9). Al igual que lo observado en el objetivo anterior, durante el desarrollo de una de las experiencias, un macho cortejó y copuló con una segunda hembra. La duración de esta segunda cópula fue algo menor que las anteriores (5.8 min.).

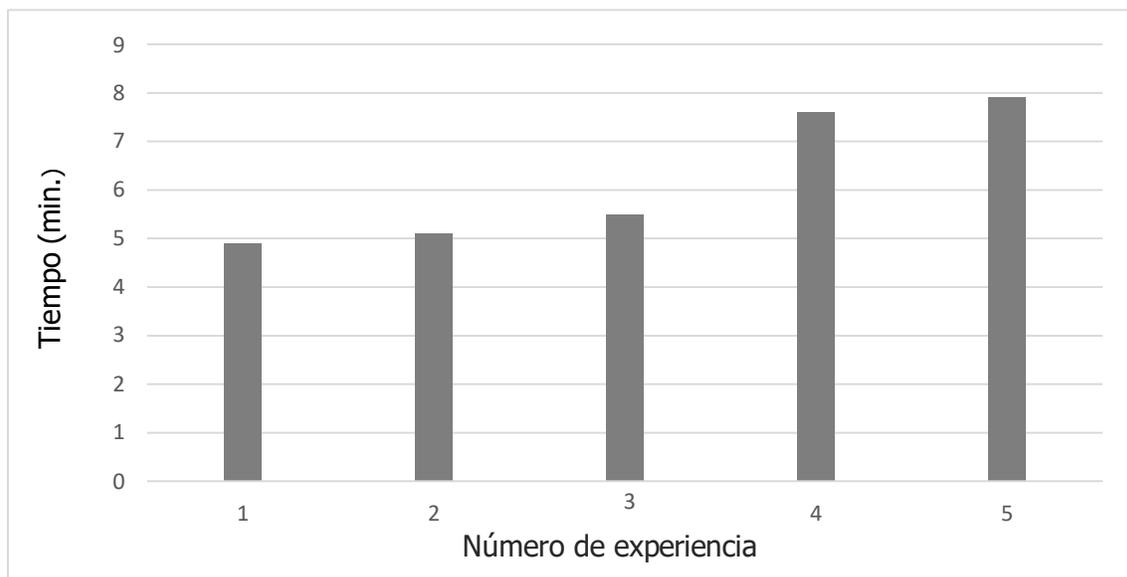


Figura 9. Duración del tiempo de cópula de *A. aculeatus* durante el objetivo 2.

No observamos una diferencia estadísticamente significativa al comparar la duración de las cópulas de este objetivo ($n = 5$) con las segundas cópulas ($n = 5$) del primer objetivo ($t = 1,08$; $p = 0.34$), utilizando el test de t para dos muestras independientes. Lo mismo sucedió al analizar la duración de las cópulas de este objetivo ($n = 5$) con las primeras cópulas del primer objetivo ($n = 13$): $t = 0,78$; $p = 0.44$. Tampoco se observaron diferencias en los comportamientos de cortejo o cópula de este objetivo con las primeras o segundas cópulas del objetivo 1.

No se observaron diferencias en el comportamiento sexual de las parejas que

copularon en este segundo objetivo al compararlas con las del primer objetivo. De las cinco parejas que copularon en este segundo objetivo solo un macho copuló con la misma hembra con la que había copulado en el primer objetivo. En el caso donde un macho copuló con dos hembras, la demora entre ambas cópulas fue de 16.3 min.

En ambos objetivos, las hembras que no fueron observadas copulando con el macho, interaccionaron con la pareja durante la cópula, utilizando sus patas II para rozar el cuerpo de ambos, o incluso, caminando por sobre ellos o por debajo de ellos. En ningún caso se observó que este comportamiento impidiera o incidiera en la separación de la pareja.

DISCUSIÓN

Este es el segundo trabajo que describe en detalle el comportamiento sexual de un opilión perteneciente a la familia Gonyleptidae de Uruguay y el primero de una especie gregaria.

Los comportamientos observados antes, durante y luego de la cópula, permiten sugerir que se encuentran enmarcados dentro del cortejo pre-copulatorio, copulatorio y post-copulatorio, tal cual se observa en otras especies de la misma familia (Stanley et al. 2016). El comportamiento sexual de *Acantopachylus aculeatus* se inicia con machos y hembras desplazándose por el sustrato lentamente, con sus patas II extendidas (Stanley et al. 2016; Machado et al. 2015). Una vez que el macho reconoce la presencia de una hembra, intensifica el toque de las patas I y II sobre el cuerpo de ella, iniciando de esta forma el cortejo pre-copulatorio. Este comportamiento puede estar relacionado con la limitación en el uso de estímulos químicos, vibratorios y acústicos de largo alcance (Edgar 1963; Willemart y Chelini 2007; Willemart et al. 2009; Fowler-Finn et al. 2014). Asimismo, Willemart et al. (2009) señalaron que tanto en pedipalpos como en patas I y II, existe una gran concentración de quimio y mecanorreceptores de contacto que parecen estar involucrados con el cortejo pre copulatorio.

La sujeción de la hembra es similar a la observada en *Pachyloides thorellii* y

Opisthoplatus prospicuus (Stanley et al. 2016, Fernández et al. 2017), el macho utiliza sus pedipalpos e inmediatamente después toca rápidamente el cuerpo de la hembra con sus patas I y II. Si la hembra acepta el cortejo masculino, permite que el macho se coloque frente a ella y la sujete con sus quelíceros y pedipalpos. De esta forma adoptan la posición copulatoria común en los Laniatores: frente a frente, con la pareja formando un ángulo cercano a los 45° (ver tabla 12.1 en Machado y Macías Ordoñez 2007, Stanley et al. 2016, Fernández et al. 2017), dando comienzo al cortejo copulatorio.

Las hembras de *A. aculeatus* mostraron comportamientos para evitar la sujeción del macho más variados a los reportados comúnmente en otras especies de Gonyleptidae. Bajar la parte delantera del cuerpo o apoyar el cuerpo en el sustrato fueron reportados previamente por Stanley et al. (2016); para *P. thorellii* y Fernández et al. (2017) para *O. prospicuus*, sin embargo, también se observó que las hembras de *A. aculeatus* pudieron girar el cuerpo completamente para evitar la sujeción del macho. Este comportamiento resultó tan efectivo como los previamente nombrados al momento de evitar los avances de los machos.

Durante el desarrollo de una de las experiencias, el macho intentó sujetar a una de las hembras a pesar de la resistencia de esta. Ante la insistencia del macho la hembra segregó sustancias químicas, las cuales no evitaron que el macho continuara insistiendo, ni que la pareja terminara copulando posteriormente. Considerando la aparente resistencia desarrollada por la hembra a la sujeción del macho y considerando que el principal rol que confiere la bibliografía a la secreción de sustancias químicas es el defensivo (Eisner et al. 2004) no podemos descartar que la hembra pudiera haber interpretado el intento de sujeción del macho como un ataque. Por otro lado el hecho de que la pareja haya terminado copulando podría estar relacionado con lo propuesto por Holmberg (1986) y Clawson (1988), quienes sugieren para algunas especies del Suborden Eupnoi, que estas sustancias podrían estar relacionadas con el reconocimiento sexual. Dado que se trató de un único caso, más estudios son necesarios para determinar si la segregación de sustancias químicas reportadas por primera vez en este estudio, está relacionada con un rol sexual, defensivo o una mezcla de ambos.

Estando la pareja en la posición copulatoria, el macho everta el pene que es introducido en el orificio genital femenino. Durante todo este proceso y hasta la separación de la pareja, el macho toca suavemente el cuerpo de la hembra utilizando sus patas I. A diferencia de lo observado por Stanley (2018) y Stanley et al. (2023) en *P. thorellii*, no se observó si la hembra protruye la boca y/o abre el opérculo para permitir el acceso del pene. Tampoco fue posible observar si los machos de *A. aculeatus* evertan su pene previo a la sujeción de la pareja como fue observado por Stanley y Toscano-Gadea (2011b). Estudios a futuro buscarán determinar el momento exacto de la eversión del pene y que comportamientos realiza la hembra a los efectos de considerar si ella colabora con la cópula, abriendo el opérculo y evertiendo el ovipositor para permitir el ingreso del pene como *P. thorellii* (Stanley et al. 2023).

A diferencia de lo reportado en otras especies de opiliones, los machos de *A. aculeatus* realizaron durante el cortejo copulatorio, una serie de flexiones de las patas IV. Si bien la intensidad de estas flexiones es visible a través del desplazamiento de la hembra por el sustrato no sabemos si este comportamiento cumple con una función interna durante la cópula. Estudios recientes realizados por Iglesias et al. (2022) han arrojado luz sobre el funcionamiento del pene y el ovipositor en Laniatores, estos autores señalan que comportamientos como lo observado en *A. aculeatus* pueden estar relacionados con la remoción de esperma o la estimulación genital femenina.

En cuanto a la remoción de esperma, observaciones recientes de Stanley et al. (2024) confirman la presencia de aglutinaciones de esperma sobre y dentro de los campos de microsetas del pene de los machos de *P. thorellii*. Estudios con Microscopía Electrónica permitirán determinar si los penes de *A. aculeatus* poseen este tipo de microsetas, pero considerando la correspondencia que existe en los penes de la familia Gonyleptidae (Kury y Villarreal 2015), es posible que se encuentren presentes en el pene de *A. aculeatus*.

Asimismo, otra posible explicación de este comportamiento podría estar relacionada con el hecho de la inmovilidad del esperma presente en Laniatores (Morrow 2004). Dado que el esperma de los machos es depositado en el lumen del

ovipositor, sin alcanzar los receptáculos seminales femeninos, estas flexiones buscarían depositar el esperma más profundo en el lumen y acercarse lo más posible a los receptáculos de la hembra. Más estudios relacionados con aspectos morfológicos y fisiológicos de la cópula son necesarios para comprender este comportamiento.

De todas formas, y considerando que observamos estas flexiones tanto en las cópulas correspondientes con el objetivo 1 (donde utilizamos hembras vírgenes), como en el objetivo 2 (donde utilizamos hembras copuladas), no podemos descartar que este comportamiento pueda estar relacionado con la estimulación genital femenina y/o con una forma de determinar la calidad masculina (Eberhard 1998).

La duración de la cópula en *A. aculeatus* (en ambos objetivos) es similar a la observada en otras especies de Gonyleptidae (Matthiesen 1983; Elpino-Campos et al. 2001; Machado y Macías-Ordóñez 2007; Nazareth y Machado 2009; 2010; Stanley y Toscano-Gadea 2011b; Stanley et al. 2016) y al igual que lo señalado por Stanley et al. 2016; cerca del 80% ocurre mientras el macho realiza cortejo copulatorio. Este comportamiento es común dentro del Orden y estaría relacionado con la estimulación de la hembra y la mayor duración de las cópulas (Machado y Macías-Ordóñez 2007).

A diferencia de lo observado en otras especies de Gonyleptidae, la duración del cortejo post-copulatorio en *A. aculeatus* fue menor. Tanto el macho como la hembra de *A. aculeatus* permanecen menos tiempo juntos una vez finalizada la cópula, en comparación a la que realiza el opilión solitario *P. thorellii*, aunque similar a la duración del también gregario *O. prospicuus* (Stanley 2016, Stanley y Toscano-Gadea 2011a). Esta menor permanencia podría ser una estrategia para evitar los conflictos entre machos llevando a una reducción del cortejo post copulatorio (Mora 1990; Machado y Macías Ordoñez 2007; Nazareth y Machado 2009; 2010; Stanley et al. 2016). Asimismo, es posible que la alta capacidad de agregarse de *A. aculeatus* explique este comportamiento ya que en este escenario encontrar una pareja sexual distinta a la anterior, tanto para las hembras como para los machos, sería accesible en el corto plazo. Capocasale y Bruno-Trezza (1964); Capocasale y Gudynas (1993); Toscano-Gadea y Simó (2004) y Perrone (2016) señalaron la

formación de agrupaciones muy numerosas de esta especie en refugios criptozoicos. Además, Perrone (2016) determinó que estas agregaciones no son permanentes, sino que se forman dependiendo de las características de los refugios, por lo cual los integrantes que conforman estas agregaciones no necesariamente son los mismos individuos siempre.

Existen tres hipótesis para explicar el comportamiento gregario de los opiliones (Holmberg et al. 1984; Machado et al. 2000), las cuales plantean: 1) Que aumenta la capacidad de defensa frente a potenciales predadores; 2) Que mejora la protección contra la deshidratación y 3) Que mejora en el éxito reproductivo. El hecho de que los machos de *A. aculeatus* fueran capaces de cortejar y copular con otras hembras luego de una primera cópula, sin esperar un tiempo demasiado prolongado, parece apoyar esta última hipótesis. Si a esto sumamos que más de una hembra de *A. aculeatus* fue capaz de copular con un macho durante ambos objetivos (N=5 para el objetivo 1 y N=1 para el objetivo 2) podemos sugerir que la estrategia reproductiva del *A. aculeatus* estaría enmarcada dentro de la Poliginandria. Más experiencias donde la hembra tenga acceso a más de un macho son necesarios para confirmar este punto.

En relación con las interacciones de otras hembras durante la cópula, si bien no podemos descartar que sea el resultado de las condiciones experimentales (tamaño de la arena), la presencia de sustancias químicas volátiles durante el cortejo masculino ha sido sugerida para otras especies de Gonyleptidae (Fernández et al. 2017). Además, Requena y Machado (2015) determinaron que las hembras de Gonyleptidae *Iporongaia pustulosa* son capaces de evaluar la condición corporal de los machos a través de la presencia de carbohidratos cuticulares durante el apareamiento.

Considerando el carácter gregario y la baja capacidad de desplazamiento de la especie (Perrone 2016) son necesarios estudios a futuro que analicen en detalle estas interacciones bajo la hipótesis de la existencia de feromonas masculinas y la evaluación de las hembras a los machos durante el apareamiento. Asimismo, sería interesante determinar si estas interacciones de otras hembras puede explicar la variación observada en la duración de las segundas cópulas

observadas durante el objetivo 1 y la latencia entre ellas.

Si bien las experiencias de este trabajo fueron realizadas durante el periodo de actividad de superficie de *A. Aculeatus* (Perrone 2016) esta especie parece necesitar condiciones de estudio más exigentes que las observadas en otras especies de Gonyleptidae (58 experiencias y 13 copulas). A pesar de ello, los resultados obtenidos permiten asegurar que *A. aculeatus* posee comportamientos que lo transforman en un excelente modelo para poner a prueba mecanismos de selección sexual, tanto pre como post copulatorios. ¿Qué rol cumplen las segundas cópulas observadas en esta especie? ¿Por qué duran menos tiempo que las primeras? ¿Son las flexiones de patas IV realmente una forma de estimular a la hembra? ¿Qué rol juega la interacción de otras hembras en la pareja durante la cópula? ¿Esta interacción podría ser una forma evaluación del macho durante la cópula? ¿Es posible que la pareja genere señales químicas durante el cortejo o la cópula que atraigan a otras hembras receptivas? Estas son algunas de las preguntas que nos invitan a profundizar en el conocimiento del comportamiento sexual de este Gonyleptidae gregario.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi familia y en especial a mis 2 abuelos que fueron mis pilares a lo largo de toda mi vida y que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

Agradezco a mi esposa Lorena Calistro que día tras día me anima a perseguir mis sueños y a una personita muy especial en estos últimos tiempos, mi hija Larissa que se la dedico esta realización y que por ella conseguí finalizar esta jornada.

Le agradezco muy profundamente a mi tutor Gabriel Francescoli y co-tutor

Carlos Toscano-Gadea por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr y llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional. Extiendo mi agradecimiento a Macarena Gonzalez, por la colaboración en el análisis de los test estadísticos.

Por último agradecer a la Universidad de la Republica y a la Facultad de Ciencias, que me ha exigido tanto, pero al mismo tiempo me ha permitido obtener mi tan anhelado título. Agradezco a cada directivo por su trabajo y por su gestión, sin lo cual no estarían las bases ni las condiciones para aprender los conocimientos requeridos.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, L. E. (2002). Patrones zoogeográficos de los opiliones argentinos (Arachnida: Opiliones). *Revista Ibérica de Aracnología*, 6: 69-84.

Acosta, L. E. (2021). The return of a forgotten harvestman: revalidation of *Gonyleptes robustus* Holmberg, 1876, as the second species of *Acanthopachylus* Roewer, 1913 (Arachnida, opiliones, Gonyleptide). *Zootaxa* 5040 (3): 428-438.

Acosta, L. E. & Machado, G. (2007). Diet and Foraging. In: Pinto-da-Rocha R., Machado G. & Giribet, G. (eds.) *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, p. 309-338.

Alcock, J. (1994). Post insemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annual review of Entomology*, 39(1): 1-21.

Andersson, M. B. (1994). *Sexual Selection*. Princeton University Press. New Jersey, E.U.A.

Arnqvist, G. & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and

- female fitness in insects. *Animal Behaviour*, 60(2): 145-164.
- Austad, S. N. (1984). Evolution of sperm priority patterns in spiders. In: Sperm competition and the evolution of mating systems. Harvard University Press, E. U. A.
- Bateman, A.J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 349-368.
- Blumstein, D. T., Daniel, J. C. y Evans, C. S. (2000). JWatcher. version 0.9. Disponible en <http://www.jwatcher.ucla.edu/>.
- Buzzato, B. A. & Machado, G. (2008). Resource defence polygyny shifts to female defense polygyny over the course of the reproductive season of a Neotropical harvestman. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 85-94.
- Buzatto, B. A., Requena, G. S., Lourenço, R. S., Munguía-Steyer, R. & Machado, G. (2011). Conditional male dimorphism and alternative reproductive tactics in a Neotropical arachnid (Opiliones). *Evolutionary Ecology*, 25(2): 331-349.
- Capocasale, R. & Bruno-Trezza, L. (1964). Biología de *Acanthopachylus aculeatus* (Kirby, 1819), (Opiliones: Pachylinae). *Revista de la Sociedad Uruguaya de Entomología*, 6: 19–32.
- Capocasale, R. & Gudynas, E. (1993). La fauna de opiliones (Arachnida) del criptozoos de Sierra de las Animas (Uruguay). *Aracnología*, 19(20): 1-15.
- Carranza, J. (1994). *Etología: Introducción a la Ciencia del Comportamiento*. Publicaciones de la Universidad de Extremadura. Cáceres, España.
- Clawson, R. L. (1988). Morphology of defensive glands of the opilioids (daddy longlegs) *Leiobunum vittatum* and *Leiobunum flavum* (Arachnida: Opiliones: Palpatores: Phalangiidae). *Journal of Morphology*, 196:363-381.
- Coddington, J. A., Horner, M. & Soderstrom, E. A. (1990). Mass Aggregations in Tropical Harvestment (Opiliones, Gragrellidae: *Prionostemma* sp.) *Revue Arachnologique*. 8(13): 213-219.
- Cotton, S., Small, J. & Pomiankowski, A. (2006). Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, 16(17): R755-R765.
- Curtis D. J. & Machado, G. (2007). Ecology. In: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. &

- Giribet, G. (eds.) Harvestmen: The biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge, p. 280–308.
- Darwin, C. (1871). The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex. John Murray Ed. Dover Publications, U.K.
- Eberhard, W. G. (1985). Sexual selection and animal genitalia. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Eberhard, W. G. (1996). Female control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Eberhard, W. G. (1998). Importancia de la elección femenina crítica para la etología. *Etología* (6): 1-8.
- Edgar, A. L. (1963). Proprioception in the legs of phalangids. *The Biological bulletin*, 124: 262-267.
- Edgar, A. L. (1971). Studies in the biology and ecology of Michigan Phalangida (Opiliones). *Miscellaneous Publications. Museum of Zoology, University of Michigan*, 144: 1-64.
- Eisner, T., Rossini, C., Gonzáles, A., Eisner, M., (2004). Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *Journal of Experimental Biology* 207, 1313-1321.
- Elgar, M. A., (1998). Sperm competition and sexual selection in spiders and other archnids. In: Birkhead, T. R. & Moller, A. P. (eds.). *Sperm competition and sexual selection*. San Diego, California, Academic press, p. 307-339.
- Elgar, M. A., (2005). Polyandry, sperm competition, and sexual conflict. In: Boluis, J. J., Giraldeau, L. A. & Hogan J. (eds.) *The Behavior of Animals: Mechanisms, Function, and Evolution*. Blackwell Publishing Ltd., E.U.A. p. 272-293.
- Elpino-Campos, A., Pereira, W., Del Claro, K. & Machado, G. (2001). Behavioural repertory and notes on natural history of the Neotropical harvestman *Discocyrtus oliverioi* (Opiliones: Gonyleptidae). *Bulletin of the British. arachnological Society*, 12(3): 144-150.

- Emlen, S. T. & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197(4300): 215-223.
- Fernández, N., Stanley, E., Costa, F., Toscano-Gadea, C. A. & Willemart, R. (2017). Chemical sex recognition in the harvestman *Discocyrtus prospicuus* (Arachnida: Opiliones). *Acta Ethologica* (20), 215-221. doi:10.1007/s10211-017-0264-5.
- 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(12-13): 1663-1686.
- Ghiselin, M. T. (2010). The distinction between primary and secondary sexual characters. In: Leonard, J. L. & Córdoba-Aguilar, A. (eds.) *The evolution of primary sexual characters in animals*. Oxford University Press, E.U.A. p. 9-14.
- Giribet, G., Edgecombe, G. D., Wheeler, W. C. & Babbitt, C. (2002). Phylogeny and systematic position of Opiliones: a combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics*, 18: 5-70.
- Giribet, G., Rambla, M., Carranza, S., Baguna, J., Riutort, M. & Ribera, C. (1999). Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2): 296-307.
- Giuliani, L. (2008). *La familia Gonyleptidae en el Uruguay* (Arachnida, Opiliones). Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Uruguay.
- Gnaspini, P. & Hara, M. (2007). Defense mechanisms. In: Pinto-da-Rocha R., Machado G. & Giribet, G. (eds.) *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, p. 374-399.
- Hammer, O., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D (2003). Past Paleontological, version 1.18. Disponible en <http://foly.uio.no/ohammer/past>.
- Holmberg, R.G. (1986). The scent glands of Opiliones: a review of their function. Pp.

- 131-133 in Proceedings of the 9th International Arachnological Congress (W.D. Eberhard, Y. D. Lubin y B.C. Robinson eds.) Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Holmberg, R. G., Angerilli, N. P. D. & La Casse, L. J. (1984). Overwintering aggregations of *Leiobunum paessleri* in caves and mines (Arachnida, Opiliones). *Journal of Arachnology*, 12: 195-204.
- Huber, B. A. (2005). Sexual selection research on spiders: progress and biases. *Biological Reviews*, 80: 363-385.
- Iglesias, P. P., Pereyra, M. O., Stanley, E., Toscano-Gadea, C. A., & Pérez-González, A. (2022). Different environment, different reproductive strategies? Unexpected field observations in the harvestmen *Discocyrtus prospicius* (Laniatores: Gonyleptidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94 (Suppl. 4): 1-9.
- Krebs, J. R. y Davis, N. B. (1993). *An Introduction to behavioural ecology*. 3ra Edición. Blackwell Science Ltd, E. U. A.
- Kury, A. B. (2003). Annotated catalogue of the Laniatores of the New World: (Arachnida, Opiliones). *Revista ibérica de Aracnología*, Volúmen especial monográfico 1, 335 p.
- Kury, A. B. (2013). Order Opiliones Sundevall, 1833. In: Zhang, Z. Q. (ed.) *Animal Biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic Richness (Addenda 2013)*. *Zootaxa*, 1-82.
- Kury, A. B. & Villarreal, O. M. (2015). The prickly blade mapped: establishing homologies and a chaetotaxy for macrosetae of penis ventral plate in Gonyleptoidea (Arachnida, opiliones, Laniatores). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 174: 1-46.
- Machado, G. & Macías-Ordóñez, R. (2007). Reproduction. In: Pinto-da-Rocha R., Machado G. & Giribet, G. (eds.) *Harvestmen: the biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, p. 414-454.
- Machado, G.; Raimundo, R. L. & Oliveira, P. S. (2000). Daily activity schedule,

- gregariousness, and defensive behaviour in the Neotropical harvestman *Goniosoma longipes* (Opiliones: Gonyleptidae). *Journal of Natural History*, 34: 587-596.
- Machado, G.; Requena, G. S. & Buzatto, B. A. (2009). Comportamento reprodutivo de Opiliões (Arachnida): Sistemnas de acasalamento e cuidado parental. *Oecologia Brasiliensis*, 13(1): 58- 79.
- Machado, G., Requena, G., Toscano-Gadea, C. A. & Stanley, E. (2015). Male and Female Mate Choice in Harvestmen: General Patterns and Inferences on the Underlying Processes. In: Peretti, A. V. & Aisenberg, A. *Cryptic Female Choice in Arthropods*. Springer International Publishing, p. 169-201.
- Macías-Ordóñez,R., Machado, G., Perez-González, A, y Shultz, J. W. (2010). Capítulo 13: Genitalic Evolution in Opiliones en the Evolution of Primary Sexual Characters in Animals. Oxford University Press. E. U. A.
- Matthiesen, F. A. (1983). Comportamento sexual de um opilião brasileiro *Discocyrtus pectinifemur* Mello Leitão, 1937 (Opiliones, Gonyleptidae). *Ciência e Cultura*, 35: 1339-1341.
- Mora, G. (1990). Parental Care in a neotropical harvestman, *Zygopachylus albomarginis* (Arachnida, Opiliones: Gonyleptidae). *Animal Behaviour*. 39:582-593.
- Morrow, E. H. (2004). How the sperm lost its tale: the evolution of anagellate sperm. *Biological Reviews*, 79: 795-814.
- Nazareth, T., & Machado, G. (2009). Reproductive behavior of *Chavesincola inexpectabilis* (Opiliones, Gonyleptidae) with description of a new and independently evolved case of paternal care in harvestmen. *The 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.
- Orians, G. H. (1969). On the evolution of mating systems in birds and mammals. *The*

- American Naturalist, 103(934): 589-603.
- Parker, G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 45: 525-567.
- Parker, G. A. (1974). Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies. *Behaviour*, 48(1-4): 157-183.
- Parker, G. A. (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press. San Diego, E.U.A. p. 2-55.
- Parker, G. A., Baker, R. R. & Smith, V. G. F. (1972). The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 36 (3): 529-553.
- Patriquin, K. J., Leonard, M. L., Broders, H. G. & Garroway, C. J. (2010). Do social networks of female northern long-eared bats vary with reproductive period and age?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 899-913.
- Perrone, M. (2016). Dinámica anual de una población de Opiliones epigeos (*Acanthopachylus aculeatus*) en un área costera del Río de la Plata. Tesina de grado, Universidad de la República. Uruguay.
- Pinto da Rocha, R. y Giribet, G. (2007). Taxonomy. In *Harvestmen: Pinto-da-Rocha R., Machado G. & Giribet, G. (eds.). The Biology of Opiliones*. Harvard University Press. Cambridge, p. 88-246.
- Requena, G. S. & Machado, G. (2015). Effects of egg attendance on male mating success in a harvestman with exclusive paternal care. *Behavioral Ecology*, 26(3): 926-935.
- Santos, F. H. (2007). Ecophysiology. In: *Pinto-da-Rocha R., Machado G. & Giribet, G. (eds.) Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge, p. 473-488.
- Shultz, J. W. (2007). A phylogenetic analysis of the arachnid orders based on morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150(2): 221-265.

- Shultz, J. W. & Regier, J. C. (2000). Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein–encoding genes supports a crustacean+ hexapod clade. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1447): 1011-1019.
- Simmons, L. W. (2001). *Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects*. Princeton University Press. E. U. A.
- Simmons, L. W. (2005). The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection and offspring viability. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36: 125-146.
- Stanley, E. (2012). Comportamiento sexual y estrategias reproductoras en *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae). Tesina de grado. Universidad de la República. Uruguay.
- Stanley, E. (2018). Serenata de contacto: Efecto del cortejo copulatorio sobre el éxito de cópula en el opilión *Pachyloides thorellii* (Opiliones, Gonyleptidae). Tesis de Maestría, Pedeciba, IIBCE, UdelaR.
- Stanley, E. & Toscano-Gadea, C. A. (2011a) Comportamiento sexual en *Discocyrtus prospicuus* (Opiliones, Gonyleptidae): cuánto más conocemos más nos preguntamos. Tercer Congreso Latinoamericano de Aracnología, 4 al 9 de diciembre del 2011, Quindío, Colombia. p. 176.
- Stanley, E. & Toscano-Gadea C. A. (2011b) Nuevos conocimientos sobre un viejo conocido: comportamiento sexual en *Acanthopachylus aculeatus* (Opiliones, Gonyleptidae). Tercer Congreso Latinoamericano de Aracnología, 4 al 9 de diciembre del 2011, Quindío, Colombia. p. 166.
- Stanley, E., Francescoli, G. & Toscano-Gadea, C. (2016). Mating behavior of the solitary harvestman *Pachyloides thorellii* (Arachnida: Opiliones). *Journal of Arachnology*, 44 (2):210–217.
- Stanley, E., Machado, G. & Aisenberg, A. (2023). Sexual dialogue in *Pachyloides thorellii* (Opiliones: Gonyleptidae): a Neotropical harvestman with much to say. *Journal of Arachnology*, (51): 90-100.

- Stanley, E., Aisenberg, A., Brech, D. E., Porto, w. & Pérez – González, A. (2024). FIRST EVIDENCE OF SPERM REMAINS ON PENIS AFTER MATING IN Opiliones (Opiliones: Gonileptidae: *Pachyloides thorellii*). Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology, <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2024.05.006>
- Thornhill, R. (1983). Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. The American Naturalist, 122 (6): 765-788.
- Tinbergen, J. (1964). Social behaviour in animals. Springer Science & Business Media.
- Toscano-Gadea, C. A. & Simó, M. (2004). La fauna de opiliones de un área costera del Río de la Plata (Uruguay). Revista Ibérica de Aracnología, (10): 157-162.
- Trivers, R. (1972). Parental Investment and Sexual Selection. In: Campbell, B. (ed.) Sexual Selection and the Descent of Man, 1871-1971. Chicago, Aldine Publisher, p. 271-285.
- Willemart, R. H. & Chelini, M. C. (2007). Experimental demonstration of close-range olfaction and contact chemoreception in the Brazilian harvestman, *Iporangaia pustulosa*. Entomología Experimentalis et Applicata, 123: 73-79.
- Willemart, R. H., Osses, F., Chelini, M. C., Macías-Ordóñez, R. & Machado, G. (2009). Sexually dimorphic legs in a neotropical harvestman (Arachnida, Opiliones): ornament or weapon? Behavioural Processes, 80 (1): 51-59.
