

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**REPRODUÇÃO DO ESCORPIÃO *Tityus pusillus* POCOCK, 1893:
COMPORTAMENTO DE CORTE E DIMORFISMO**

Recife, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**REPRODUÇÃO DO ESCORPIÃO *Tityus pusillus* POCOCK, 1893:
COMPORTAMENTO DE CORTE E DIMORFISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal da
Universidade Federal de Pernambuco,
como exigência para a obtenção do grau
de mestre em Biologia Animal.

Aluna: Laís Macedo Pordeus

Orientadora: Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Pordeus, Laís Macedo

Reprodução do escorpião *Tythus pusillus* Pocock, 1893: comportamento de corte e dimorfismo / Laís Macedo Pordeus- Recife: O Autor, 2016.

61 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Animal, 2016.

Inclui referências

- 1. Escorpião 2. Reprodução 3. Feromônio I. Albuquerque, Cleide Maria Ribeiro (orientadora) II. Título**

595.46

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-264

LAÍS MACEDO PORDEUS

**REPRODUÇÃO DO ESCORPIÃO *Tityus pusillus* POCOCK, 1893:
COMPORTAMENTO DE CORTE E DIMORFISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como exigência para a obtenção do grau de mestre em Biologia Animal.

Data de defesa: 26/08/2016

Banca Examinadora:

Dra. Luciana Iannuzzi (UFPE)

Dr. Artur Campos Dália Maia (UFPE)

Dr. René Duarte Martins (UFPE/CAV)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, mesmo que não tenham concordado com a minha decisão de fazer o mestrado, nunca tentaram proibir ou fizeram confusão por causa disso.

A minha orientadora, Cleide, que me aceitou no laboratório e não desistiu de mim mesmo com nossas metodologias de trabalho não batendo e eu deixando ela louca.

A André e Filipe pela grande ajuda nas noites de experimento que seguiam até muito tarde da noite. Ainda bem que demos sorte nas vezes que ficamos trancados no prédio após os experimentos. Agradeço também a Rafael, irmão de Filipe, que foi acordado às 22h30 e veio socorrer a gente na primeira vez.

Para complementar os agradecimentos a André, agradeço pela ideia do projeto, que me tirou da estagnação e me trouxe de volta para o campo, por fazer a frente com a orientadora para ela me aceitar, pelos campos e pelo compartilhamento de conhecimento sobre escorpiões, fofocas e tudo o mais.

Ao pessoal do laboratório, atuais e antigos, principalmente a Gabi gordinha (só para irritar ela), Víctor e Fabrícia, os quais pedi em diversas ocasiões que cuidassem das minhas centenas de escorpiões sempre que eu não podia ou ia para o campo. A Adriana, Welton e Aspig que junto com os outros aguentaram muita reclamação, já que é meu esporte preferido.

A Rodolfo (porque eu prometi um parágrafo para ele) por me arrumar vários itens durante emergências para os experimentos.

De última hora a Nair, que se disponibilizou a editar algumas imagens usadas no trabalho aos 45 do segundo tempo e fez um trabalho impecável.

"O senhor poderia me dizer, por favor, qual o caminho que devo tomar para sair daqui?"

"Isso depende muito de para onde você quer ir", respondeu o Gato.

"Não me importo muito para onde...", retrucou Alice.

"Então não importa o caminho que você escolha", disse o Gato.

Lewis Carroll

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Vista dorsal de <i>Tityus pusillus</i> Pocock 1893	19
Figura 2. Remanescentes de Floresta Atlântica no município de Sirinhaém, PE.....	21
Figura 3. Estruturas corporais utilizadas na análise do dimorfismo sexual de <i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893.	22
Figura 4. Pedipalpo de <i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893 mostrando o posicionamento dos sete landmarks digitalizados no TPSdig	23
Figura 5. Dança do escopião <i>Tityus pusillus</i> observado sob luz ultravioleta. Macho a direita e fêmea a esquerda	24
Figura 6. Análise de Componentes Principais dos indivíduos fêmeas e machos de <i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893 segundo caracteres morfológicos examinados	27
Figura 7. Comparação entre os caracteres morfométricos das fêmeas e machos de <i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893	28
Figura 8. Gráfico da PCA.....	29
Figura 9. Análise discriminante da forma da quela após uma média das categorias	31

Capítulo 2

Figure 1. Diagram of the chemical recognition experiments.....	49
Figure 2. <i>Tityus pusillus</i> males mistaking one another for a female and trying to copulate after exposition to a substrate previously exposed to females.....	54

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Sumário da comparação entre os caracteres morfológicos dos machos e fêmeas de *Tityus pusillus* padronizados pelo comprimento total do corpo (mm) e autovalores da ordenação segundo os dois primeiros eixos da PCA.

.....29

Tabela 2. Variação de tamanho centroide na análise morfométrica dos machos de *Tityus pusillus*.....30

Tabela 3. Variação da forma das quelas nos morfotipos dos machos de *Tityus pusillus*.....30

Tabela 4. Relação entre a robustez (espessura) da quela de machos de *Tityus pusillus* e o comportamento de abordagem à fêmea31

Capítulo 2

Table 1. Remnants of the Atlantic Forest from the state of Pernambuco, Brazil, collect locations and the quantity of animals used in experiments.....47

Table 2. Chemical recognition of females by *Tityus pusillus* males.....52

Table 3. Behavior evaluation of visual recognition by *Tityus pusillus* males.....53

Table 4. Behavior of *Tityus pusillus* males in the presence of a substrate with and without previous exposure to females.....54

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
OBJETIVOS	12
Geral	12
Específicos	12
HIPÓTESES	12
CAPÍTULO 1	13
REFERENCIAL TEÓRICO	13
Escorpiões	13
Dimorfismo sexual e intrasexual	15
Comportamento de corte	17
O escorpião <i>Tityus pusillus</i>	18
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Dimorfismo sexual	20
Dimorfismo de machos	22
Influência da robustez da quela na corte	23
Análise de dados	25
RESULTADOS	26
Dimorfismo sexual	26
Dimorfismo de machos	29
Influência da robustez da quela na corte	31
DISCUSSÃO	32

REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2	44
Pretty or smelly? Triggering the courtship behavior in the scorpion <i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893 (Scorpiones: Buthidae)	44
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
MATERIALS AND METHODS	47
Animal care.....	47
Apparatus.....	48
Chemical recognition.....	48
Visual recognition.....	49
Data analyses.....	50
RESULTS	51
Chemical recognition.....	52
Visual recognition.....	53
DISCUSSION	56
REFERÊNCIAS	59
CONCLUSÕES FINAIS	62

INTRODUÇÃO

Entre os escorpiões, o comportamento de corte envolve uma “dança”, que pode apresentar pequenas variações entre as espécies. Embora no Brasil haja registro de, pelo menos, 131 espécies de escorpiões, estudos sobre aspectos do comportamento reprodutivo são escassos e focados em espécies urbanas causadoras de acidentes fatais em humanos.

Nesse trabalho, foram analisados aspectos reprodutivos do escorpião *Tityus pusillus* Pocock, 1893, com ênfase no dimorfismo sexual e intrasexual dos machos e se o morfotipo dos machos influencia na corte, além de observações sobre os mecanismos pelos quais os machos reconhecem as fêmeas (química e/ou visual). O escorpião *T. pusillus* é uma espécie de pequeno porte com ampla distribuição por toda a região nordeste do Brasil, tendo registradas ocorrências para a Floresta Atlântica e para a Caatinga. Também há registro de acidente em área rural, sendo a sintomatologia da intoxicação considerada moderada. Este registro sugere uma potencial adaptação desse animal ao ambiente periurbano. Desse modo, o conhecimento de sua biologia reprodutiva é importante para o entendimento da dinâmica das populações desta espécie.

A dissertação está apresentada na forma de capítulos que seguem as normas da ABNT para realização de trabalho científico. No que se refere ao objetivo, relacionado ao tipo de mecanismo usado pelos machos para identificação das fêmeas como parceiras, os dados estão apresentados na forma de manuscrito a ser submetido seguindo as normas do periódico escolhido.

RESUMO

O reconhecimento de parceiros é fundamental para a reprodução de uma espécie. Visando conhecer aspectos da reprodução em escorpiões da Floresta Atlântica, nesse trabalho analisou-se o dimorfismo sexual na espécie *Tityus pusillus* Pocock, 1893, a existência de morfotipos entre os machos e se as diferenças influenciam na corte. Avaliou-se também o modo de reconhecimento das parceiras (químico e/ou visual) pelos machos. Para a avaliação do dimorfismo sexual, foram mensuradas diferentes estruturas corporais no prossoma, mesossoma e metassoma de machos e fêmeas. A existência de morfotipos foi investigada considerando-se características anatômicas da quela (robusta/esguia) dos machos, sendo também investigado o efeito dessas diferenças na abordagem à fêmea para a corte. As análises de reconhecimento foram realizadas com base na alteração do comportamento do macho diante de uma fêmea, outro macho ou substratos previamente expostos ou não a fêmeas. O dimorfismo sexual em *T. pusillus* foi evidente tanto na comparação entre os caracteres isoladamente como simultaneamente. Foi confirmada a existência de morfotipos entre os machos, mas essa característica não influencia na abordagem e quantidade de cópulas. Os machos alteram o comportamento quando encontram um local previamente exposto a fêmeas, mas não são capazes de reconhecer-las pela visão. Além disso, tentam desenvolver o comportamento de corte com outros machos quando em ambiente exposto a fêmeas. Os resultados confirmam a existência de morfotipos entre os machos e o dimorfismo sexual na espécie e sugerem que o mecanismo de reconhecimento de parceiros seja químico.

Palavras chave: Scorpiones, Buthidae, dimorfismo inter-intrasexual, reconhecimento de parceiro, ferômonio, estratégia reprodutiva

ABSTRACT

Recognition of partners is crucial for the reproduction of a species. Aiming to know aspects of reproduction in scorpions of the Atlantic Forest, this study analyzed the sexual dimorphism in the species *Tityus pusillus* Pocock, 1893, the existence of morphotypes between males and if those differences influence in courtship. It was also evaluated how the males recognize females (chemically and/or visually). For the evaluation of sexual dimorphism, several body structures were measured in the porsome, mesosome and metasome of 634 males and females. The existence of male morphotypes was investigated per anatomical characteristics of their chela (robust/slend), also investigating the effect of those characteristics on the female approach to courtship. The recognition analysis were based in the males' behavior alteration when before a female, another male or substrate with and without previously exposition to females. Sexual dimorphism in *T. pusillus* was evident in the comparison between the characters alone or simultaneously. It was confirmed the existence of males morphotypes, but this characteristic doesn't influence the approach and amount of copula. Males changed behavior when they find a previously exposed to female site, but were not able to recognize them by sight. Moreover, they attempted to develop courtship behavior with other males while in females exposed site. The results confirm the existence of sexual dimorphism in the species and between males and suggests that the partner recognition engine is chemical.

Keywords: Scorpiones, Buthidae, dimorphism inter-intrasexual, partner recognition, pheromones, reproductive strategies.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar aspectos morfológicos e fisiológicos do escorpião *Tityus pusillus* que podem influenciar no comportamento de corte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a existência de dimorfismo sexual na espécie;
2. Avaliar a possível existência de morfotipos entre as quelas dos machos;
3. Verificar se a diferença na forma da quela dos machos interfere no comportamento de corte;
4. Observar se machos respondem a sinais químicos e/ou visuais das fêmeas

HIPÓTESES

1. Ocorre dimorfismo sexual em *T. pusillus*.
2. Machos de *T. pusillus* apresentam diferença na forma da quela do pedipalpo.
3. As diferenças na forma das quelas dos machos interferem no comportamento de corte, com indivíduos de quelas robustas tendo mais sucesso na abordagem às fêmeas.
4. Machos de *T. pusillus* reconhecem as fêmeas através de sinais químicos e não visuais.

REFERENCIAL TEÓRICO

ESCORPIÕES

A Ordem Scorpiones é o mais antigo e basal grupo de Arachnida, tendo sua primeira aparição como organismos aquáticos no Siluriano, entre 450 e 425 milhões de anos atrás, agregando poucas mudanças morfológicas desde então (BROWNELL E POLIS, 2001). Essa baixa quantidade de mudanças morfológica é atribuída, principalmente, à grande plasticidade ecológica, fisiológica, química e comportamental que o grupo apresenta (POLIS, 1990). Isso também causa uma grande variação de ecomorfótipos, fazendo com que o grupo, apesar de não ter uma grande variação na forma básica, apresente uma grande variação no tamanho e forma das estruturas, como nos pedipalpos e opistossoma, de acordo com o ambiente onde vivem (BECCALONI, 2010).

Esses aracnídeos contam com 16 famílias, 155 gêneros e aproximadamente 2200 espécies (REIN, 2016), com ampla distribuição, ocorrendo em todos os continentes com exceção da Antártida (POLIS, 1990). São predadores eficientes e parte disso se deve a serem animais peçonhentos, com glândulas que produzem uma mistura complexa e específica de toxinas inoculadas através do aguilhão localizado no télson (POLIS, 1990; BROWNELL E POLIS, 2001). Poucas espécies de escorpiões produzem toxinas que são letais aos humanos, a maioria causa apenas dor local, mas espécies como *Hottentotta tamulus*, Fabrius, 1798, considerada o escorpião mais perigoso do mundo, podem causar uma morte rápida, esta espécie em particular pode causar a morte em algumas horas devido problemas cardiovasculares, pulmonares e

edema, podendo levar a falência múltipla dos órgãos (BAWASKAR, 1977; ISMAIL E BAWASKAR, 1995; BAWASKAR E BAWASKAR, 2008). A peçonha é uma mistura de neurotoxinas, sais e vários compostos orgânicos, também pode conter enzimas que facilitem a penetração da peçonha no tecido (BECCALONI, 2010). Como defesa, algumas espécies do gênero *Parabuthus* conseguem esguichar a peçonha, principalmente quando seguradas pelo metassoma (BECCALONI, 2010; NISANI E HAYES, 2015). No Brasil, as espécies que mais causam acidentes sérios são *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922, *Tityus bahiensis*, Perty, 1833, *Tityus obscurus*, Gervais, 1843 e *Tityus stigmurus* Thorell, 1876, sendo *T. serrulatus* o maior causador de acidentes no país (EICKSTEDT, 1983; CUPO *et al.*, 1994; CANDIDO, 1999; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001; ALVES *et al.*, 2007; PARDAL *et al.*, 2014).

Escorpiões são em sua maioria solitários e pouco tolerantes com invasores, mesmo da mesma espécie e casos de canibalismo são frequentes em várias famílias, principalmente no pós-coito (POLIS, 1990). Poucas espécies apresentam sociabilidade e formação de colônias, que podem ser de famílias, fêmeas com filhotes no segundo instar ou instares mais avançados, auxiliando na caça e proteção, ou não familiares, com indivíduos de uma mesma espécie, não relacionados entre si, dividindo abrigos (POLIS, 1990; BECCALONI, 2010). A respeito de sua reprodução, os escorpiões são animais vivíparos e sexuais, no entanto, a partenogênese foi registrada em algumas espécies (LOURENÇO, 2008). O desenvolvimento embrionário pode ser de dois tipos: apoicogênico, ocorrendo ao longo de túbulos ovarianos, com oócitos ricos em vitelo e caitocogênicos, com o desenvolvimento embrionário ocorrendo em divertículos e os oócitos pobres em vitelo (HJELLE, 1990; POLIS e SISSOM, 1990;

VOLSCHENK et. al., 2008, WARBURG, 2010). O ciclo de vida é muito variável com duração entre 6 a 83 meses, dependendo da espécie, após sofrer em média seis ecdises (POLIS 1990; SISSOM, 1990).

DIMORFISMO SEXUAL E INTRASEXUAL

Dimorfismo sexual é uma ocorrência frequente entre os animais, podendo consistir de diferentes variáveis, que vão desde o tamanho e a forma, até aspectos da fisiologia (CHENG E KUNTNER, 2015). Apesar disso, a maioria das pesquisas enfatizam o dimorfismo sexual de tamanho devido a sua importância relacionada a parâmetros ecológicos e reprodutivos, além de ser fundamental em estudos de taxonomia e para o estabelecimento das relações entre tamanho e forma (CHENG E KUNTNER, 2015).

Segundo o modelo do equilíbrio diferencial, o dimorfismo sexual acontece quando as pressões de seleção opostas se equilibram diferencialmente nos diferentes sexos (BLANCKENHORN, 2005), desse modo, o dimorfismo reflete vantagens adaptativas selecionadas ao longo do tempo. Em artrópodes, é comum o aparecimento de fêmeas maiores que machos, um aspecto importante no processo reprodutivo que sugere uma maior quantidade e qualidade de prole (BLANCKENHORN, 2005). O custo e benefício normalmente diferem em machos e fêmeas para atingir determinado tamanho corporal sob influência da seleção natural ou sexual (CROWLEY, 2000; GAFFIN E BROWNELL, 2001; KLADT, 2003). Em casos de características sexuais secundárias, geralmente possuem uma alometria positiva, devido a pressões intrassexuais, indivíduos maiores teriam características maiores (EBERHARD 1985, 1996). Várias

estruturas dos animais são propensas a seleção tanto natural quanto sexual, como patas, antenas e chifres (EBERHARD, 1996, 2004, 2010). Um grande número de machos adultos de várias espécies de aranhas utiliza as patas e quelíceras para a corte e para o deslocamento e a caça, respectivamente (STRATTON *et al.* 1996; EBERHARD E HUBER, 1998; BARRANTES, 2008; AISENBERG E BARRANTES, 2011).

O dimorfismo morfológico entre machos é menos frequente e, evolutivamente, pode surgir por intensa competição entre eles (ZATZ *et al.*, 2011). Em alguns escorpiões, o dimorfismo geralmente está associado a defesa de fêmeas, com machos maiores brigando entre si e devorando ou repelindo os pequenos (BENTON, 1992). Algumas vezes, o dimorfismo entre machos está associado a uma estratégia alternativa de reprodução, cada grupo dimórfico de macho age de modo diferente para alcançar o sucesso reprodutivo. Em opiliões, por exemplo, machos menores infiltram-se em territórios controlados por machos maiores para copular com fêmeas (BUZATTO E MACHADO, 2014). Em escorpiões, o dimorfismo sexual e alometria é descrito para algumas espécies das famílias Vaejovidae, Scorpionidae e Buthidae (HARADON, 1984; KOVARIK, 2004; OZKAN *et al.*, 2006; BOOMCHAM *et al.*, 2007; SANCHEZ-QUIROS *et al.*, 2012). As principais diferenças encontradas entre machos e fêmeas de escorpião são encontradas no tamanho do prossoma e mesossoma e no tamanho do metassoma, fêmeas usualmente apresentam o prossoma e o mesossoma maiores que os machos, e estes apresentam o metassoma maiores que os das fêmeas (POLIS E SISSOM, 1990).

COMPORTAMENTO DE CORTE

A reprodução dos escorpiões apresenta um comportamento de corte peculiar, conhecido como “dança”, um ritual que compreende quatro fases: início, *promenade a deux*, transferência do espermatóforo e término, podendo haver variações em cada fase entre as espécies quanto a duração e os movimentos utilizados para cortejar a fêmea (POLIS, 1990). A primeira fase, a “iniciação”, é caracterizada pela aproximação e reconhecimento do parceiro, geralmente essa aproximação é feita pelo macho; a segunda fase é conhecida como “promenade à deux”, onde após ter segurando os dois pedipalpos da fêmea, o macho a conduz até um local adequado para a deposição do espermatóforo; a terceira fase, a “transferência”, ocorre a transferência do espermatóforo, onde o macho puxa a fêmea rapidamente e a posiciona sobre a estrutura; a quarta fase, o “término”, os indivíduos se separam, nessa hora pode haver casos de canibalismo (POLIS E SISSOM, 1990; POLIS, 1990). Apesar dessa “dança” ser uma característica comum a todas as espécies de escorpiões, os estímulos que levam a esse ritual são pouco conhecidos.

Os escorpiões apresentam uma grande variação comportamental durante a corte. Alguns machos repetem comportamentos em mais de uma fase, como exemplo abrir o pente e “varrer” o chão, esse movimento pode ser observado em diferentes fases da corte, e outros comportamentos são restritos a uma fase específica da corte, por exemplo, em algumas espécies os machos batem na fêmea com o metassoma e a ferroam, comportamentos restritos a fase de iniciação (POLIS E SISSOM, 1990). O canibalismo pré-corte é um risco recorrente na reprodução dos escorpiões, assim, machos normalmente usam de artifícios comportamentais para apaziguar a fêmea durante a fase de iniciação,

como por exemplo as marteladas com o metassoma e as ferroadas (POLIS E SISSOM 1990; BENTON 1992; TALLAROVIC *et al.* 2000).

O ESCORPIÃO *TITYUS PUSILLUS* POCK, 1893

Com cerca de 125 espécies (REIN, 2016), o gênero *Tityus* Koch, 1836 representa a maior riqueza de espécies da família Buthidae e apresenta uma ampla distribuição, sendo encontrados desde a Costa Rica até a Argentina Central e Republica Dominicana (FRANCKE E STOCKWELL, 1987, ARMAS E ABUD ANTUN, 2004, OJANGUREN AFFILASTRO, 2005). Espécies desse gênero possuem uma ampla distribuição pelo Brasil e podem ser encontradas em quase todos os biomas que ocorrem no território (LOURENÇO, 2002), tendo 47 espécies descritas (ALMEIDA, 2010).

Tityus pusillus (Figura 1) foi descrita inicialmente, a partir de duas fêmeas coletadas na região de Igarassu, Pernambuco (LOURENÇO, 1982a), levando a crença de que a espécie seria endêmica da região do Centro de Endemismo de Pernambuco. No entanto, estudos posteriores mostraram que essa espécie possui ampla distribuição na região nordeste do Brasil, sendo encontrada nos estados de Sergipe, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e o Rio Grande do Norte (LOURENÇO, 2002; DIAS *et al.*, 2006; PORTO *et al.*, 2010), tendo registradas ocorrências tanto para a Floresta Atlântica e quanto para a Caatinga (DIAS *et al.*, 2006; PORTO *et al.*, 2014; LIRA *et al.*, 2013).



Figura 1. Vista dorsal de *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Foto: Autor)

O tamanho do escorpião *T. pusillus* varia entre 25-34 mm e a coloração desse escorpião é caracterizado por uma cor que varia de amarelada até marrom-avermelhado, com uma pigmentação variegada negra por todo o corpo e tendo os dois últimos segmentos do metassoma e o télson avermelhados (LOURENÇO, 1982a). Pouco se sabe ainda sobre a biologia da espécie, os primeiros relatos sobre reprodução e ecologia foram feitos por Lourenço (1982a) com um trabalho sobre uma fêmea com 10 filhotes obtida em uma coleta na Estação Ecológica de Tapacurá, em Pernambuco, e que a espécie provavelmente viveria embaixo de pedras, mas atualmente apareceram novas informações acerca do assunto. A espécie é amplamente distribuída na Floresta Atlântica, correspondendo a cerca de 90% da fauna de escorpiões (LIRA E ALBUQUERQUE, 2014). Pode ser encontrado principalmente no epifolhíço, no qual apresenta uma correlação positiva com a massa seca da liteira, e apresenta um comportamento de caça do tipo “sit and wait”, onde o escorpião fica parado e captura as presas que passem em sua frente, comportamento típico dos escorpiões (POLIS, 1990, LIRA *et al.*, 2013, LIRA E DE SOUZA, 2014, LIRA *et*

al. 2015). As fêmeas apresentam iteroparidade, tendo até três ninhadas com uma média de sete filhotes cada durante o ano e esses filhotes levam cerca de oito meses para atingirem a maturidade, apresentando protandria, com os machos atingindo a maturidade primeiro que as fêmeas (ALBUQUERQUE E LIRA, 2016). Dentre casos raros de mutação genética, foi relatado a ocorrência de leucismo em uma fêmea encontrada em Paudalho (PE) (LIRA *et al.* 2016).

A sintomatologia do acidente com essa espécie pode ser considerada moderada, com sintomas caracterizados por calafrios, tontura, cefaleia, vômito, dor e dormência do local, dados obtidos a partir de dois casos ocorridos no estado de Pernambuco (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Dimorfismo sexual

Para verificar se a espécie apresenta dimorfismo sexual, medidas foram tiradas numa amostra de 634 *T. pusillus* (211 machos e 423 fêmeas) que se encontram depositados na Coleção Aracnológica da Universidade Federal de Pernambuco. Estes animais foram coletados em 11 fragmentos de Floresta Atlântica no município de Sirinhaém (08°35'27"S, 35°06'58"W) (Figura 2), no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, entre dezembro de 2012 e janeiro de 2013.

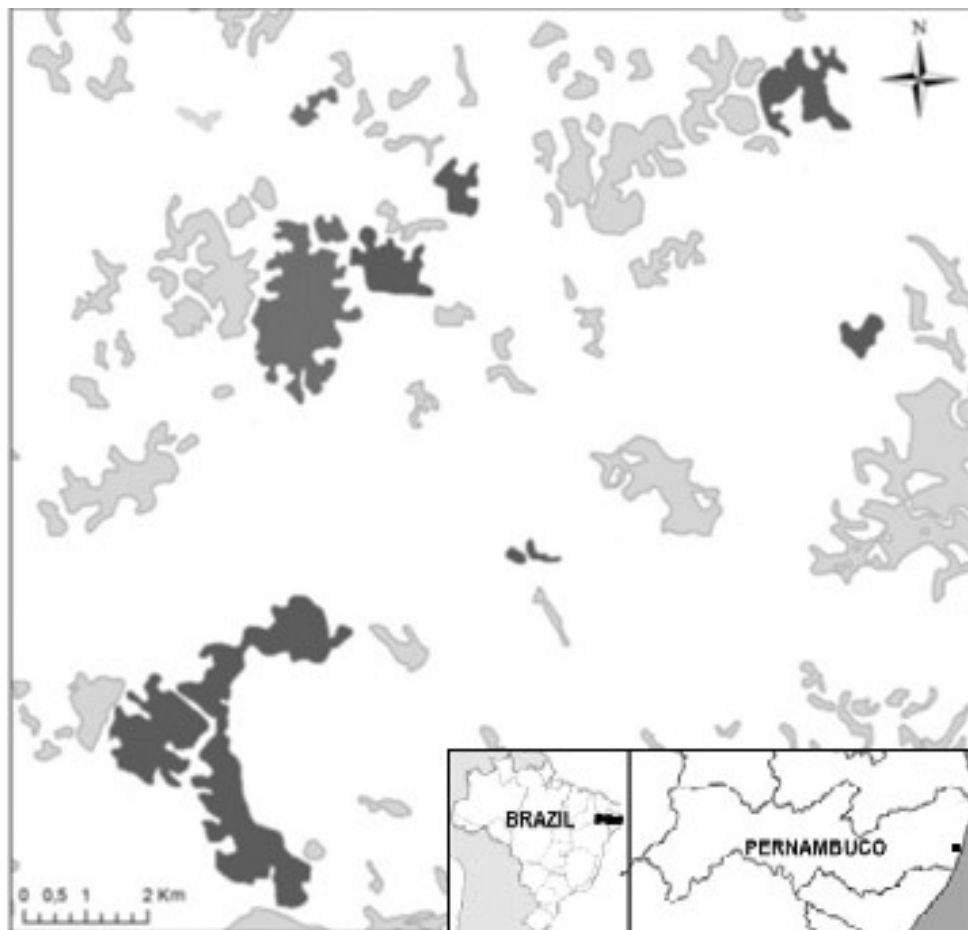


Figura 2. Remanescentes de Floresta Atlântica no município de Sirinhaém, PE. As áreas escuras representam os fragmentos onde foram realizadas as coletas dos escorpiões (Retirado de Lira *et al.*, 2015).

Para este teste foram selecionados sete caracteres merísticos compartilhados entre machos e fêmeas, 1) comprimento do prossoma, 2) comprimento do mesossoma, 3) comprimento do metassoma, 4) comprimento e 5) espessura da quela, 6) comprimento e 7) espessura do segmento V do metassoma (Figura 3). As medidas foram tomadas com o auxílio de um paquímetro digital.

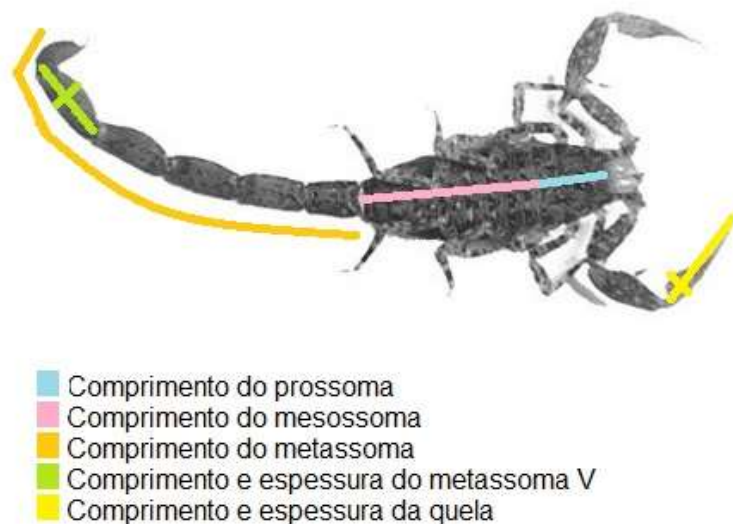


Figura 3. Estruturas corporais utilizadas na análise do dimorfismo sexual de *Tityus pusillus* Pococok, 1893

Morfotipos de machos

A existência de morfotipos de machos foi avaliada através da morfometria geométrica, essa técnica apresenta maior sensibilidade para análise de diferenças mais sutis, não detectáveis com a morfometria linear. Os 211 machos do estudo de dimorfismo sexual, foram classificados de acordo com a espessuras de suas quelas em duas categorias, sendo $< 1,4$ mm classificados como quela esguia e $\geq 1,4$ mm classificados como quela robusta. Nesses grupos, 40 machos foram selecionados ao acaso, 20 considerados com a quela robusta e 20 considerados com a quela esguia. As quelas dos machos foram fotografadas por câmera Canon A620 acoplada à um microscópio estereoscópico usando um adaptador.

As fotos foram tratadas no programa TPSutil (ROHLF, 2010) e transportadas para o programa TPSdig (ROHLF, 2010) para a colocação das marcas (figura 4).

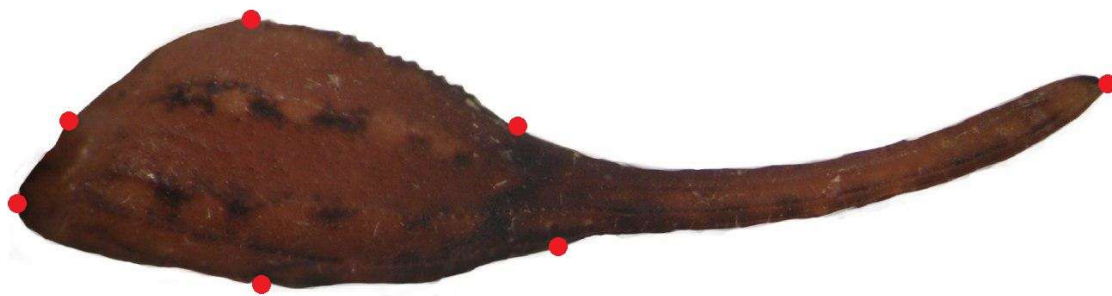


Figura 4. Quela de *Tityus pusillus* mostrando o posicionamento das sete marcas (pontos vermelhos) digitalizados no TPSdig.

Influência da robustez da quela na corte

Os escorpiões usados neste estudo foram coletados ao acaso na zona da mata sul, norte, no agreste do estado de Pernambuco, Brasil, com lanternas portáteis ultravioletas (Figura 5). Como a espécie costuma ser tolerante com co-específicos, os machos e fêmeas foram separados e mantidos em colônias para facilitar a manutenção semanal. Cada colônia foi mantida em recipiente plástico transparente de 1L e continha no máximo 30 escorpiões. Três a cinco camadas de caixas de ovos de papelão foram oferecidas como abrigo no interior do recipiente. Os animais foram alimentados semanalmente com baratas da espécie *Phoetalia circumvagans* Burmeister, 1838 e tinham algodão molhado como fonte de água. O ambiente de criação foi mantido a um ciclo de 12:12 h L:D com um temporizador e temperatura ambiente média de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\% \pm 5\%$ de umidade relativa.



Figura 5. Escorpião *Tityus pusillus* observado sob luz ultravioleta. (Foto: Autor)

Todos os testes de comportamento foram realizados sob luz vermelha, invisível aos escorpiões (MACHAN, 1968), sendo conduzidos entre 19 h e 22 h, intervalo de máxima atividade, diminuindo, assim, interferências em seus comportamentos.

Para o experimento de corte foi utilizado uma arena de vidro circular (12 cm diâmetro; 7 cm altura). Essa arena era limpa com álcool 70% antes de cada teste e como substrato foi usado um papel filtro circular ocupando toda a base da arena. Machos ($n = 20$) das colônias foram separados por robustez das quelas, quela esguia ($n = 10$) e quela robusta ($n = 10$), e pareados com fêmeas ($n = 20$). Em cada situação, um casal proveniente do mesmo ponto de coleta era colocado simultaneamente na arena, totalizando 20 observações.

A abordagem à fêmea foi considerada a partir do momento em que o macho tentou segurar qualquer parte do corpo da parceira, observando-se 1) agarrar patas, mesossoma, metassoma ou quelas, 2) quais estruturas eram

agarradas ao mesmo tempo, 3) quantas vezes o macho manipulou entre as estruturas, 4) se houve desistência, considerada quando o macho passa a ignorar a presença da fêmea depois de tentar segurar, 5) tempo de *promenade a deux*, contado a partir do momento que as duas quelas eram seguradas, e 6) se houve conclusão (cópula). O tempo de observação variou de acordo com o tempo levado para desistência ou conclusão da corte.

Análise de dados

Para comparar os caracteres morfológicos de machos e fêmeas os caracteres foram comparados por testes de Kruskal-Wallis. A similaridade entre os machos e fêmeas considerando simultaneamente todas as variáveis morfológicas (exceto o comprimento total) foi determinada por uma Análise de Similaridade (ANOSIM) no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). A comparação entre machos e fêmeas foi ilustrada por meio de uma Análise de Componentes Principais (PCA) no programa CANOCO 4.5 (TER BRAAK AND ŠMILAUER, 2002).

A comparação da forma das quelas dos machos foi realizada a partir das marcações indicadas nas fotos. Esses dados serviram para criação de uma matriz de covariância, usada para análise de componentes principais (PCA). A partir da matriz de covariância também foi realizado uma análise de variância (ANOVA) de procrustes e discriminante (DA). As análises estatísticas foram conduzidas no programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011).

Para comparar a manipulação das fêmeas e as tentativas de corte entre os grupos de machos com quelas esguias e robustas, foi utilizado o teste de

Mann-Whitney no programa Bioestat 5.3 (AYRES et al., 2007). Foi considerado o nível de significância $P < 0,005$.

RESULTADOS

Dimorfismo sexual

O dimorfismo sexual em *T. pusillus* foi evidente tanto na comparação entre os caracteres isoladamente (Figura 6; Tabela 1) como simultaneamente (ANOSIM: $R = 0.4195$; $P = 0.001$, $N = 634$; Figura. 7). Apenas o comprimento das quelas não apresentou diferenças quanto ao tamanho entre os sexos. Por outro lado, as fêmeas de *T. pusillus* são maiores, com o prossoma e mesossoma maiores que os machos, que por sua vez possuem o metassoma mais longo (Tabela 1, Figuras 6 e 7). O comprimento destes caracteres foram os que mais contribuíram para a distinção entre os sexos no primeiro componente principal que somado ao segundo expressaram 96% da variação dos dados (Eixo 1 = 53.1%; Eixo 2 = 42.9%) (Tabela 1; Figura 7).

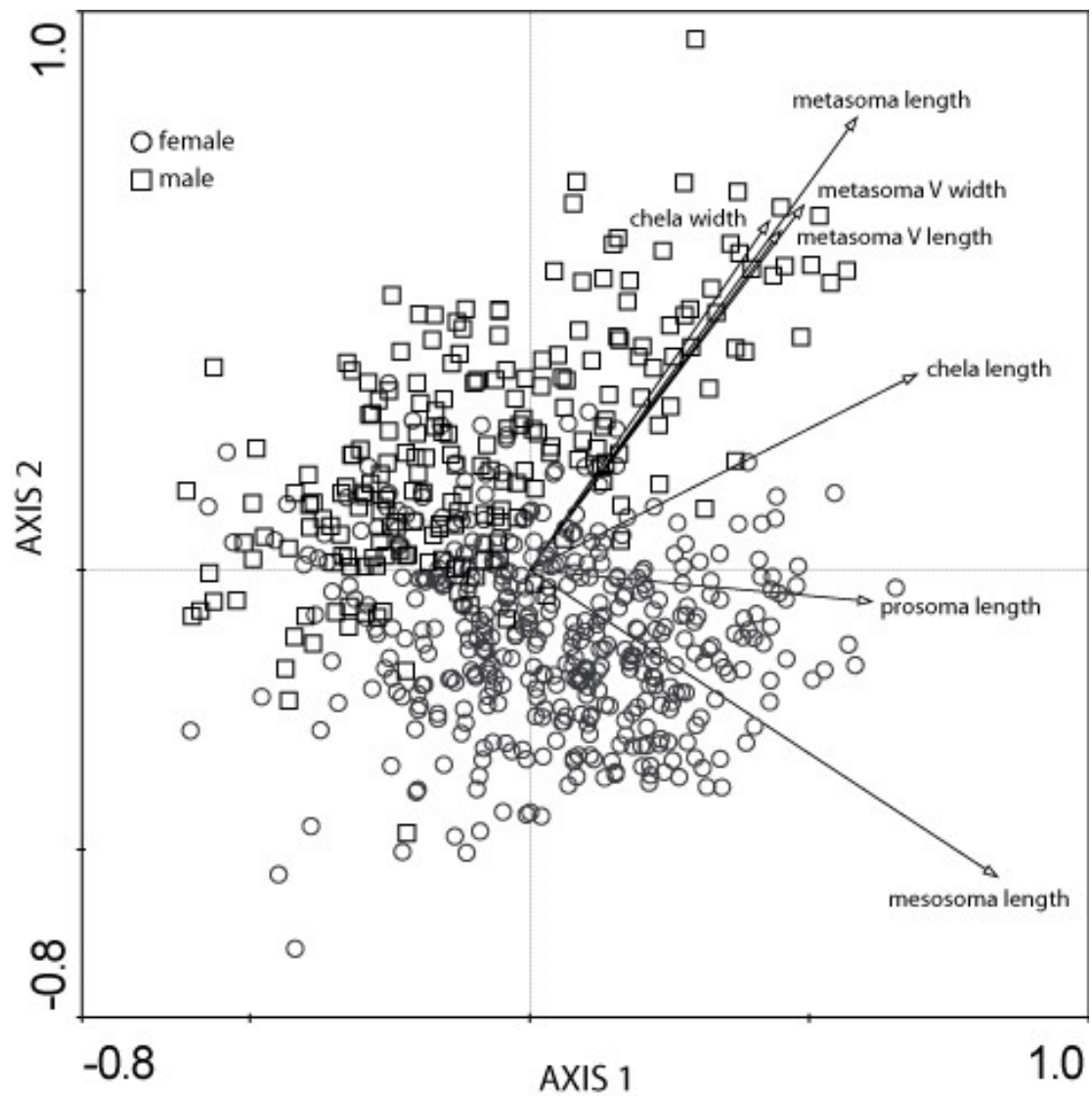


Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA) dos indivíduos, fêmeas e machos, de *Tityus pusillus* segundo caracteres morfológicos examinados. PCA eigenvalues: Axis 1 = 0.513; Axis 2 = 0.446.

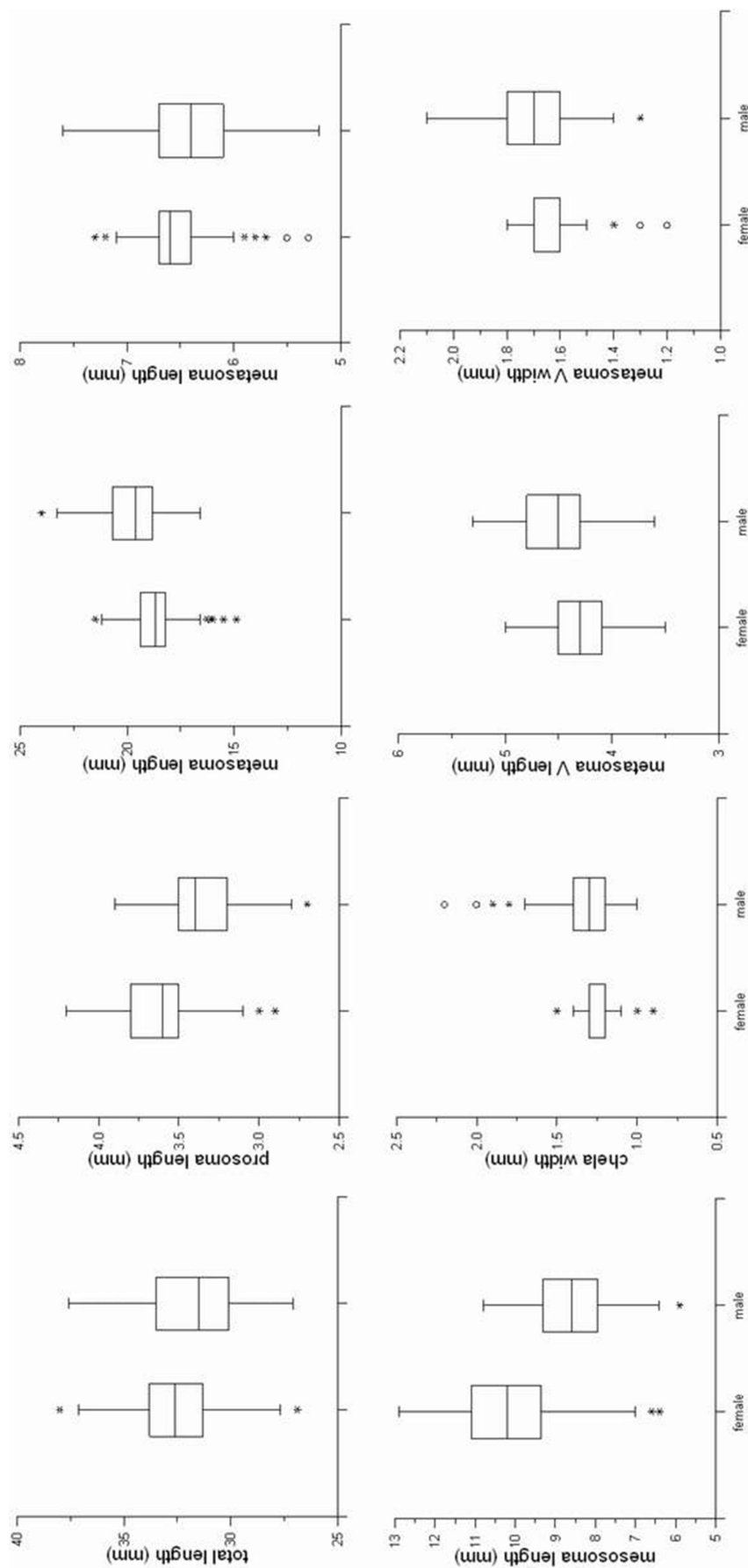


Figura 7. Comparação entre os caracteres morfométricos das fêmeas e machos de *Tityus pusillus*. Os asteriscos indicam possíveis outliers, as linhas horizontais a mediana e as verticais o intervalo de confiança (95%).

Tabela 1. Caracteres morfológicos dos machos e fêmeas de *Tityus pusillus*, sumário da comparação entre os caracteres de ambos os sexos padronizados pelo comprimento total do corpo (mm) e autovalores da ordenação segundo os dois primeiros eixos da PCA. O teste de Kruskal-Wallis apontou que comprimento total das fêmeas foi maior que o dos machos ($H_1 = 20.575$; $P < 0.001$; $N = 634$).

Estrutura (mm)	Sexo (Média±DP)		Relação estrutura/ Comprimento total (mm)		PCA Eigenvalues	
	Fêmea (N = 423)	Macho (N = 211)	H ₁	P	Axis 1	Axis 2
Comprimento Prossoma	3.6 ± 0.2	3.3 ± 0.2	137.13	<0.001	0.611	-0.056
Comprimento Mesossoma	10.1 ± 1.2	8.6 ± 0.9	276.03	<0.001	0.836	-0.549
Comprimento Metassoma	18.7 ± 0.9	19.8 ± 1.5	342.942	<0.001	0.584	0.810
Comprimento Metasoma V	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3	169.066	<0.001	0.448	0.607
Largura Metasoma V	1.6 ± 0.09	1.7 ± 0.1	210.84	<0.001	0.490	0.653
Comprimento Quela	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.4	3.256	0.071	0.692	0.351
Largura Quela	1.2 ± 0.08	1.3 ± 0.2	141.325	<0.001	0.428	0.625
Comprimento total	32.5 ± 1.8	31.8 ± 2.3				

Morfotipos de machos

O gráfico encontrado na PCA (Figura 8) mostra que os machos se separam em dois grupos, quelas esguias e quelas robustas. Houve o registro da ocorrência de um outlayer. O resultado da PCA é confirmado pela ANOVA (Tabela 2 e 3) e DA (Figura 9).

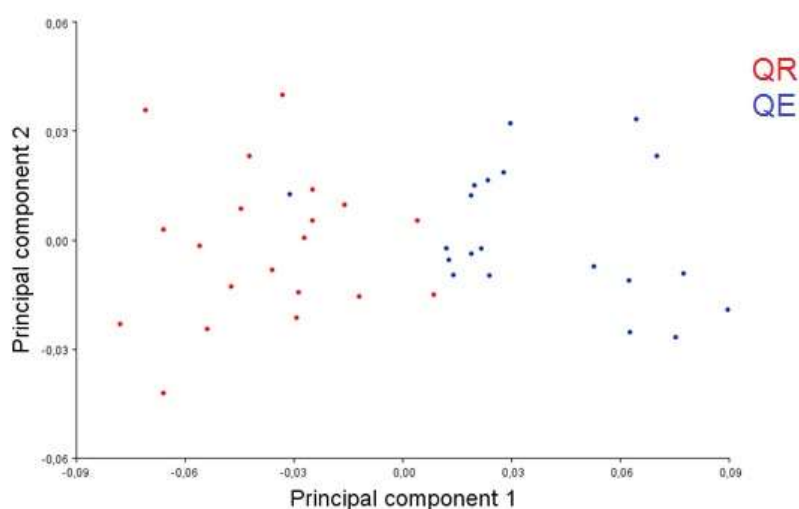


Figura 8. Gráfico da PCA. QR: Machos com quela robusta, QE: machos com quela esguia.

Tabela 2. Variação de tamanho centróide, ANOVA dimorfismos dos machos. Soma hierárquica de quadrados ANOVA: SS, MS e DF referem-se respectivamente à soma dos quadrados, média da soma dos quadrados (ou seja, SS dividido por df) e graus de liberdade.

Effect	SS	MS	df	F	P
Indivíduo	1,343055	0,070687	19	1,35	0,2604
Tamanho	6,338275	6,338275	1	120,92	<.0001
Indivíduo*Tamanho	0,995953	0,052419	19		

Tabela 3. Variação da forma, ANOVA dimorfismos dos machos. Soma hierárquica de Procrustes quadrados ANOVA: SS, MS e DF referem-se respectivamente à soma dos quadrados, média da soma dos quadrados (ou seja, SS dividido por df) e graus de liberdade.

Effect	SS	MS	df	F	P
Indivíduo	0,02999779	0,0001127737	266	0,90	0,8110
Tamanho	0,05587119	0,0039907992	14	31,76	<.0001
Indivíduo*Tamanho	0,03342665	0,0001256641	266		

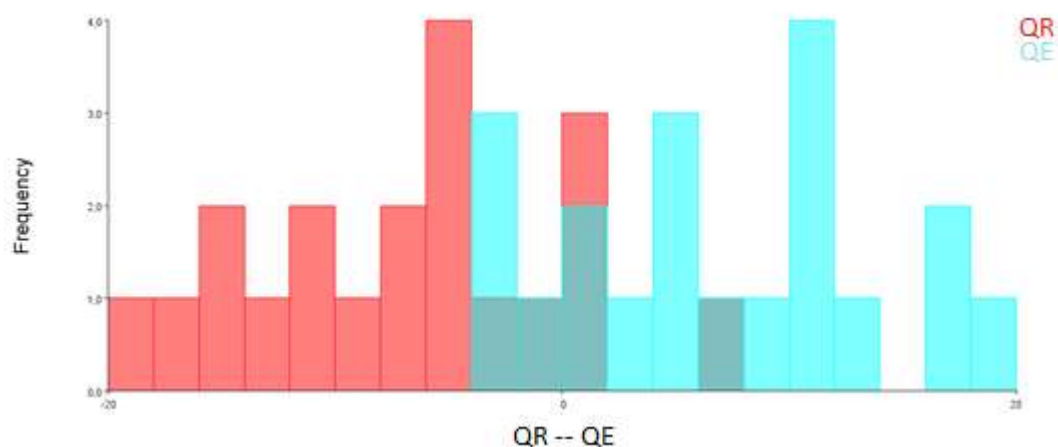


Figura 9. Análise discriminante da robustez da quela após uma média das categorias. Frequências dos escores discriminantes previstos por um jackknife (leave-one-out) de validação cruzada são mostrados usando barras do histograma; QR: Machos com quela robusta, QE: Machos com Quela esguia.

Influência da robustez da quela na corte

A robustez da quela não influenciou na abordagem à fêmea pelo macho, nem o número de cópulas (Tabela 4). O número de tentativas de aproximação ($Z = 0,4536$; $P = 0,3251$) e de quantidade de movimentos feitos durante as tentativas ($Z = 0,7559$; $P = 0,2248$) foi similar entre os grupos. Tanto nos machos

com quelas esguias quanto nos machos com quelas robustas houveram seis desistências, estes machos passaram a ignorar a fêmea após algumas tentativas, e quatro cópulas, mostrando que o tamanho das quelas não influenciou na quantidade de cópulas.

Tabela 4. Efeito da robustez da quela de machos de *Tityus pusillus* sobre o comportamento de abordagem da fêmea. Tentativas: Vezes que o macho abordou a fêmea; Manipulação: Trocas de posição de uma ou as duas quelas do macho sem soltar a fêmea; NR: Macho com quela esguia; R: Macho com quela robusta.

Indivíduos		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Tentativas	NR	1	1	3	7	4	2	8	3	4	3
	R	4	1	11	5	1	2	1	1	3	5
Manipulação	NR	9	11	3	9	3	4	14	4	3	7
	R	11	6	23	5	1	7	1	19	21	8

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o dimorfismo sexual da espécie é caracterizado por diferenças no tamanho geral, sendo as fêmeas maiores e mais robustas que os machos, tendo o prossoma e o mesossoma maiores que os machos. Os machos, por sua vez, apresentam o metassoma mais comprido que o das fêmeas. Os machos apresentaram diferenças na forma da quela, sendo estes podendo ser classificados em dois grupos, quela robusta e quela esguia, mas a robustez dessas quelas não interfere no comportamento de corte.

A diferença no tamanho do prossoma e mesossoma entre machos e fêmeas, com estas tendo essas estruturas maiores, é uma característica que

ocorre em outros escorpiões (CARLSON *et al.*, 2014; SANCHEZ-QUIROS *et al.*, 2012), assim como a presença de metassoma maior nos machos (SANCHEZ-QUIROS *et al.*, 2012). Essas diferenças corporais entre machos e fêmeas encontradas em *T. pusillius* é o esperado para os escorpiões (POLIS E SISSOM, 1990). O maior tamanho corporal das fêmeas é esperado pela relação de maior sucesso reprodutivo, onde fêmeas maiores conseguem carregar uma maior quantidade de filhotes ou filhotes de maior tamanho, interferindo diretamente na quantidade e qualidade da prole (ANDERSSON, 1994, BLANCKENHORN, 2005). Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas são esperadas devido aos diferentes papéis reprodutivos desempenhados por eles, mas essas diferenças muitas vezes estão submetidas a influências tanto naturais quanto sexuais (CROWLEY, 2000; GAFFIN E BROWNELL, 2001; KLADT, 2003). Machos de *Centruroides margaritatus* Gervais, 1841 e de *Centruroides gracilis* Latreille, 1804 amadurecem mais cedo, uma muda antes das fêmeas, podendo ser a principal causa do tamanho reduzido dos machos contrastando com o tamanho do metassoma (FRANKE E JONES, 1982, SANCHEZ-QUIROS *et al.*, 2012). Os machos de *T. pusillus* apresentam uma maturação mais rápida do que as fêmeas, chegando ao estágio adulto cerca de um mês antes, mas ambos, machos e fêmeas, apresentam muda extra praticamente na mesma proporção de ocorrência (ALBUQUERQUE E LIRA, 2016). Ainda assim, o tamanho do metassoma talvez possa ser explicado pelo rápido crescimento dos machos (REILLY *et al.* 1997).

Na literatura é possível encontrar vários casos de dimorfismos de maturação em diferentes instares ocorrendo entre machos, fêmeas ou ambos nos escorpiões (FRANKE E SISSOM, 1984). Mas não está claro se a muda extra

em *T. pusillus* (ALBUQUERQUE E LIRA, 2016) pode ser a consequência do dimorfismo entre a forma das quelas dos machos da espécie. Caso do *Euscorprios flavicaudis* DeGeer, 1778 que apresenta duas classes de tamanho de machos, um menor, maduro sexto instar, e um maior, maduro no sétimo instar (BENTON, 1991). A largura e a espessura da quela dos escorpiões estão relacionadas com a força exercida no fechamento da pinça, onde a maior largura e espessura apresenta mais força (MEIJDEN *et al.*, 2010). Sendo a quela a principal estrutura na condução da corte dos escorpiões (POLIS E SISSOM, 1990), era de se esperar que os machos com a quela robusta teriam mais força e melhor desempenho na corte, tendo mais cortes finalizadas, mas não foi o caso encontrado nos testes comparativos da corte, onde não foi encontrada diferenças na quantidade de cópulas entre os dois grupos de machos, que foi igual, tendo cada grupo concluído quatro cópulas. Em alguns aracnídeos, machos dimórficos estão associados a estratégias alternativas de reprodução. Em opiliões, por exemplo, machos maiores defendem o território para a deposição dos ovos e as fêmeas e machos menores invadem o território dos maiores e realizam cópula furtiva (ZATZ *et al.*, 2010), mas não foram observadas diferenças na tentativas e movimentos de manipulação na abordagem a fêmea em *T. pusillus*.

O escorpião *T. pusillus* apresenta um dimorfismo sexual típico da ordem Scorpiones, com fêmeas com prossoma e mesossoma maiores e machos com metassoma maiores. O dimorfismo entre as quelas dos machos embora evidente, não tem influência no comportamento durante a abordagem na corte. Os motivos de “como” e o “porquê” da presença dos dois morfotipos entre os machos da espécie ainda é incerta. É necessário o acompanhamento do

desenvolvimento dos filhotes para comprovar ou descartar a teoria do dimorfismo devido a muda extra na espécie. Assim como nos besouros do gênero *Onthophagus*, que apresentam plasticidade fenotípica influenciada pelo ambiente e pela qualidade e quantidade de alimento durante o desenvolvimento das larvas (MOCZEK, 1998, EMLÉN, 1994, 1998), é possível que o aparecimento dos morfotipos de machos de *T. pusillus* seja influenciado pelo ambiente ou pela alimentação nas fases dos instares.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que existe dimorfismo sexual na espécie *T. pusillus*, definido pelo tamanho do prossoma e mesossoma maiores na fêmea e o metassoma maior no macho. A existência de quelas com diferente robustez indicam morfotipos de machos na população, embora essa característica não tenha se mostrado relevante para a corte. Novos estudos sobre a função desses morfotipos, assim como as influências que regem as frequências desses morfotipos nas populações de *T. pusillus* da espécie, são encorajados para melhor entendimento sobre a funcionalidade dessa característica.

REFERÊNCIAS

- AISENBERG, A.; BARRANTES G. Sexual behavior, cannibalism, and mating plugs as sticky traps in the orb weaver spider *Leucauge argyra* (Tetragnathidae). *Naturwissenschaften*, v. 98, p. 605-613, 2011.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. D.; PORTO, T. J.; AMORIM, M. L. P.; NETO, S.; DE LIMA, P. Scorpionism caused by *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones; Buthidae) in State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, p. 206-208, 2009.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. D.; LIRA, A. F. A. Insights into reproductive strategies of *Tityus* (Archaeotityus) *pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones, Buthidae). *Comptes Rendus Biologies*. In press. 2016.
- ALMEIDA, R. B. Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.
- ALVES, R. S.; MARTINS, R. D.; SOUSA, D. F.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S. F.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Aspectos epidemiológicos dos acidentes escorpiônicos no estado do Ceará no período de 2003 a 2004. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*, v. 1, p. 14-20, 2007.
- ANDERSSON, M. Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1994.

- ARMAS, L. F.; ABUD ANTUN, A. J. Adiciones al género *Tityus* C. L. Koch, 1836 en República Dominicana, con la descripción de dos especies nuevas (Scorpiones: Buthidae). *Revista Ibérica de Aracnología*, v. 10, p. 53-64, 2004.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA, 2007.
- BARRANTES, G. Courtship behavior and copulation in *Tengella radiata* (Araneae, Tenggellidae). *Journal of Arachnology*. v. 36, p. 606-608, 2008.
- BAWASKAR, H. S. Scorpion sting and cardiovascular complications. *Indian Heart Journal*, v. 29, p. 228, 1977.
- BAWASKAR, H. S., BAWASKAR, P. H. Indian red scorpion envenoming. *Indian Journal of Pediatrics* v. 65, n. 3, p. 383–391, 1998.
- BECCALONI, J. Arachnids. University of California Press, 320p. 2010.
- BENTON, T. G. The life history of *Euscorpius flavicaudis* (Scorpiones: Chactidae). *Journal of Arachnology*, v. 19, p. 105-110, 1991.
- BENTON, T. G. Determinants of male mating success in a scorpion. *Animal behaviour*, v. 43, n. 1, p. 125-135, 1992.
- BLACKENHORN, W. U. Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. *Ethology*, v. 111, p. 977-1016, 2005.
- BOONCHAM, U.; SITTHICHAROENCHAI, D.; PRADATSUNDARASAR, A.; PRASARNPUN, S.; THIRAKHUPT, K. Sexual Dimorphism in the Asian Giant Forest Scorpion, *Heterometrus laoticus* Couzijn, 1981. *NU Science Journal*, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2007.

- BROWNELL, P.; G.A. POLIS. Scorpions Biology and Research. Oxford University Press. 544p. 2001.
- BUZATTO, B. A.; MACHADO, G. Male dimorphism and alternative reproductive tactics in harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Behavioural processes*, 2014.
- CANDIDO, D. M. Escorpiões. In: BRANDÃO, C. R. F., CANCELLO, E. M. (eds) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Invertebrados Terrestres, p. 23-34, 1999
- CARLSON, B. E.; MCGINLEY, S.; ROWE, M. P. Meek Males and Fighting Females: Sexually-Dimorphic Antipredator Behavior and Locomotor Performance Is Explained by Morphology in Bark Scorpions (*Centruroides vittatus*). *Plos One*, v. 9, n. 5, e97648, 2014.
- CHENG, R.; KUNTNER, M. Disentangling the Size and Shape Components of Sexual Dimorphism. *Evolutionary Biology*, v. 42, n. 2, p. 223-234, 2015.
- CROWLEY, P. H. Sexual dimorphism with female demographic dominance: age, size, and sex ratio at maturation. *Ecology*, v. 81, p. 2592-2605, 2000.
- CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, J. S. M.; HERING, S. E. Severe scorpion envenomation in Brazil: Clinical, laboratory and anatomicopathological aspects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, p. 67-76, 1994.
- DIAS, S. C.; CANDIDO, D. M.; BRESCOVIT, A. Scorpions from Mata do Buraquinho, João Pessoa, Paraíba, Brazil, with ecological notes on a population of *Ananteris mauryi* Lourenço (Scorpiones, Buthidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 3, p. 707-710, 2006.

- EBERHARD, W.G. Sexual Selection and Animal Genitalia. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 244p, 1985.
- EBERHARD, W.G. Female control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 472p, 1996.
- EBERHARD, W.G., Male-female conflict and genitalia: failure to confirm predictions in insects and spiders. *Biological Reviews*, v. 79, p. 121-186, 2004.
- EBERHARD, W.G. 2010. Rapid divergent evolution of genitalia. Theory and data updated. In Leonard J. L.; Co'rdoba-Aguilar, A. The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals. Oxford University Press, New York, 552p, p. 161-223, 2010.
- EBERHARD, W.G.; HUBER, B.A. Courtship, copulation and sperm transfer in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae) with implications for higher classification. *Journal of Arachnology*, v. 26, p. 342-368, 1998.
- EICKSTEDT, V. R. D. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae). *Memórias do Instituto Butantan*, v. 47/48, p. 133-137, 1983.
- EMLLEN, D. J. Environmental control of horn length dimorphism in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 256, p. 131-136, 1994.
- EMLLEN, D. J. Diet alters male horn allometry in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc. R. Lond. B.*, v. 264, p. 567-574, 1997.

- FRANCKE, O. F.; JONES, S. K. The life history of *Centruroides gracilis* (Scorpiones, Buthidae). *Journal of Arachnology*, v. 10, p. 223-239, 1982.
- FRANCKE, O. F.; STOCKWELL, S. A. Scorpions (Arachnida) from Costa Rica. Texas Tech University Press, Texas, 64p, 1987.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE Escorpionismo. *In*: Ministério da Saúde (org) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 2ª edição, Brasília, p. 37-44, 2001.
- GAFFIN, D.; BROWNELL, P. Chemosensory Behavior and Physiology. *In*: Brownell, P.; Polis, G. Scorpion Biology and Research, Oxford University Press, 184-203, 2001.
- HARADON, R. M. New and redefined species belonging to the *Parauroctonus baergi* group (Scorpiones, Vaejovidae). *The Journal of Arachnology*, v. 12, p. 205-221, 1984a.
- HARADON, R. M. New and redefined species belonging to the *Parauroctonus borregoensis* group (Scorpiones, Vaejovidae). *The Journal of Arachnology*, v. 12, p. 317-339, 1984b.
- ISMAIL, M.; BAWASKAR, P. H. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, v. 33, n. 7, p. 825-858, 1985.
- KLADT, N. Mechanoreception by cuticular sensillae on the pectines of the scorpion *Pandinus cavimanus*. *Dipomathesis Institute of Zoology, Bonn, Department of Neurobiology*, p. 1-73, 2003.
- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, p. 353-357, 2011.

- KOVARIK, F. A review of the Genus *Heterometrus* Ehrenberg, 1828, with Descriptions of Seven New Species (Scorpiones, Scorpionidae). *Euscorpius*, v. 15, p. 1-60, 2004.
- LEPŠ, J.; ŠMILAUER, P. Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2003.
- LIRA, A. F. A.; DE SOUZA, A. M.; SILVA FILHO, A. A. C.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Spatio-temporal microhabitat use by two co-occurring species of scorpions in Atlantic rainforest in Brazil. *Zoology*, v. 116, p. 182-185, 2013.
- LIRA, A. F. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Diversity of scorpions (Chelicerata: Arachnida) in the Atlantic Forest in Pernambuco, northeastern Brazil. *Check List*, v. 10, n. 6, p. 1331-1335, 2014.
- LIRA, A. F. A.; DE SOUZA, A. M. Microhabitat use by scorpion species (Arachnida: Scorpiones) in the montane Atlantic Rain Forest, Brazil. *Revista Ibérica de Aracnología*, v. 24, p. 107-108, 2014.
- LIRA, A. F. A.; REGO, F. N. A. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. How important are environmental factors for the population structure of co-occurring scorpion species in a tropical forest?. *Can. J. Zool.*, v. 93, p. 15-19, 2015.
- LIRA, A. F. A.; PORDEUS, L. M.; ALBUQUERQUE, C.M.R. Leucism in *Tityus pusillus* (Scorpiones: Buthidae): Report of a rare event in scorpions. *Journal of Arachnology*, v. 44, n. 2, p. 245-246, 2016.
- LOURENÇO, W. R. Contribuição ao conhecimento sistemático e biológico de *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones, Buthidae). *Revista Nordestina de Biologia*, v. 5, n. 1, p. 35-43, 1982.

- LOURENÇO, W. R. Scorpions of Brazil. Les Édition de l'If, Paris, 308p, 2002.
- LOURENÇO, W. R. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 14, n. 1, p. 19-44, 2008.
- MEIJDEN, A. V. D.; HERREL, A.; SUMMERS, A. Comparison of chela size and pincer force in scorpions; getting a first grip. *Journal of Zoology*, v. 280, p. 319-325, 2010.
- MOCZEK, A. P. Hor polyphenism in the beetle *Onthophagus taurus*: larval diet quality and plasticity in parental investment determine adult body size and male horn morphology. *Behavioral Ecology*, v. 9, n. 5, p. 636-641, 1998.
- OJANGUREN AFFILASTRO, A. A. Estudio monográfico de los escorpiones de la Republica Argentina. *Revista Ibérica de Aracnología*, v. 11, p. 75-241, 2005.
- OZKAN, O; ADIGUZEL, S.; KAR, S. Parametric values of *Androctonus crassicauda* (Oliver, 1807) (Scorpiones: Buthidae) from Turkey. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 12, p. 549-559, 2006.
- PARDAL, P. P. O.; GADELHA, M. A. C.; MENEZES, M. M. G. O.; MALHEIROS, R. S.; ISHIKAWA, E. A. Y.; GABRIEL, M. D. G. Envenenamento grave pelo escorpião *Tityus onscurus* Gervais, 1843. *Ver. Pan-Amaz Saúde*, v. 5, n. 3, p. 65-70, 2014.
- POLIS, G. A. The biology of scorpions. Stanford: Stanford University Press, 587p, 1990.
- POLIS, G. A.; SISSOM, W. D., Life history. *In*: POLIS, G. A. The Biology of Scorpions. Stanford University Press, 587p, 161-223, 1990.

- PORTO, T. J. Escorpiões da Caatinga: Conhecimentos atuais e desafios. *In*: BRAVO, F.; CALOR, A. Artrópodes do Semiárido: Biodiversidade e Conservação. Feira de Santana: Printmídia, 33-46, 2014.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2015.
- REILLY, S.M.; WILEY, E. O.; MEINHARDT, D. J. An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biological Journal of the Linnaean Society* v. 60, p.119–143, 1997.
- REIN, J. O. The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. Available 2016.03.18 from <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>, 2016.
- ROHLF, F. J. Tps Series. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York. Available: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>, 2010.
- SANCHEZ-QUIROS, C.; AREVOLO, E.; BARRANTES, G. Static allometry and sexual size dimorphism in *Centruroides margaritatus* (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Arachnology*, v. 40, p. 338-344, 2012.
- STRATTON, G. E.; HEBETS, E. A.; MILLER, P. R.; MILLER, G. L. Pattern and duration of copulation in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, v. 24, p. 186-200, 1996.

- TALLAROVIC, S. K.; MELVILLE, J. M.; BROWNELL, P. H. Courtship and mating in the giant hairy desert scorpion, *Hadrurus arizonensis* (Scorpionida, Iuridae). *Journal of Insect Behavior*, v. 13, p. 827-837, 2000.
- TER BRAAK, C. J. F.; ŠMILAUER, P. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca NY, USA, 2002.
- ZATZ, C.; WERNECK, R. M.; MACÍAS-ORDÓÑEZ, R.; MACHADO, G. Alternative mating tactics in dimorphic males of the harvestman *Longiperna concolor* (Arachnida: Opiliones). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 65, n. 5, p. 995-1005, 2011.

Pretty or smelly? Triggering the courtship behavior in the scorpion

***Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones: Buthidae)**

Laís M. Pordeus, André F.A. Lira and Cleide M.R. Albuquerque

ABSTRACT

Recognition of conspecific individuals from other community members has great importance to many interactive behaviors, especially those involved with partner selection for reproduction. Thus, in this study, we investigated how forest scorpions identify (visual or chemical) their potential partner for reproduction. The experiments were conducted with the sedentary litter-dwelling scorpion *Tityus pusillus* Pocock, 1893, a small common species broadly distributed in the Northeast Atlantic Forest in Brazil. Two sets of experiments were to test whether males recognize females by detecting females' chemicals on the substrate or by visual cues. Males changed their behavior when exposed to females' chemicals substrate, but the presence of the female with clean substrate did not changed the male behavior. When a male was placed together with another male and the clean substrate, no male changed his behavior, when using the same male pairs with an exposed to a female substrate, all the males seemed to be interested in each other and one of the males finished the courtship depositing the spermatophore on the paper. The results show that the males recognize the females by chemicals cues left on the substrate by females and not visually.

Key words: Scorpion, courtship behavior, partner recognition, pheromones, reproductive strategies.

INTRODUCTION

Recognition of conspecific individuals from other community members has great importance to many interactive behaviors, especially those involved with partner selection for reproduction (GREENFIELD, 2002). Many arachnids are solitary and to a small extent tolerant with others, even conspecifics. Few of them live in groups, so recognition of a reproductive partner is necessary (TRABALON AND BAGNÈRES, 2010). In the Order Scorpiones, most species are solitary and aggressive towards conspecifics, even feeding on them (POLIS, 1990), which may difficult the interactions for reproduction. These animals are the basal group on the Arachnida class; therefore, understanding the scorpion reproductive processes may elucidate many topics, providing information about the stimuli involved in partner recognition and reproductive behavior in arachnids (STOCKMANN AND YTHIER, 2010, TRABALON AND BAGNÈRES, 2010).

Scorpion partner recognition is a hot topic, despite this, how these animals recognize potentials partners remains unclear. Initially, it was proposed that males recognized their partners by anatomic differences between them, after the first contact (ALEXANDER, 1959, POLIS AND FARLEY, 1979). Anatomic differences in the metasoma would be critical to recognition, because the males would start contact preferably grasping this structure (ALEXANDER, 1959). However, observations of a higher concentration (2-8 individuals) of *Paruroctonus luteolus* Gertsch and Sologlad, 1966 males around females' burrows are an indicative that existence of pheromones (Polis 1990). Further studies on scorpion partner recognition showed that males can detect chemical

signals left on the substrate by the females (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, BROWNELL AND GAFFIN, 2001, MELVILLE *et al.*, 2003, STEINMETZ *et al.*, 2004, TRABALON AND BAGNÈRES, 2010, TAYLOR *et al.* 2012). Scorpions males uses the structure called pecten, located ventrally, to detect those compounds and begin the courtship behavior (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, TRABALON AND BAGNÈRES, 2010, TAYLOR *et al.* 2012).

Strikingly, most information about sexual recognition in scorpions come from species inhabiting deserts (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, MELVILLE *et al.*, 2003, STEINMETZ *et al.*, 2004, TAYLOR *et al.* 2012). Few attention was addressed to partners recognition of scorpions occurring in tropical forests. This lack of previous studies is particularly surprising in view of the high biodiversity of such environments and the evidence that environmental change is transforming the ecology of tropical forests (LEWIS *et al.*, 2009). Thus, in this study, we investigated how forest scorpions identify (visual or chemical) their potential partner for reproduction. The experiments were conducted with the sedentary litter-dwelling scorpion *Tityus pusillus* Pocock, 1893, a small (25 to 35 mm) common species broadly distributed in the Northeast Atlantic Forest in Brazil (LOURENÇO, 2002, LIRA *et al.*, 2013, LIRA *et al.*, 2015). We tested the hypotheses that due to sedentary behavior and microhabitat complexity (leaf litter) inhabiting by *T. pusillus*, these scorpion males recognize their potential partners for reproduction chemically and not visually.

MATERIALS AND E METHODS

Animal care

Adult scorpions were collected through nocturnal active search with UV lamps in remnants of the Atlantic Forest from the state of Pernambuco, Brazil (Table 1). Living animals were separated by sex and housing on a circular plastic terrarium (9,5 cm height, 12 cm diameter) with cardboard and moist cotton as shelter and water source, respectively. The scorpions were fed once a week with nymphs of cockroach *Phoetalia circunvagans* Burmeister, 1838. Females that showed pregnancy signals (distended mesosome and embryos in development visualized through the membrane) were excluded from the trials. Scorpions were reared at a temperature of $27^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$, a relative humidity of 60-70% and a 12:12h (L:D) photoperiod.

Table 1. Remnants of the Atlantic Forest from the state of Pernambuco, Brazil, collect locations and the quantity of animals used in experiments.

Locations	Coordinates	Quantity
Paudalho	7°54'48"S, 35°02'36"W	2
Jaqueira	8°43'03"S, 35°50'21.6"W	10
Ipojuca	8°31'48"S, 35°01'05"W	16
Recife	8°00'00"S, 34°56'00"W	8
Moreno	8°06'38.1"S, 35°06'56.4"W	6
Buíque	8°35'08.2"S, 37°14'29.3"W	34

Two sets of experiments were conducted between 19-22 h under red light, which is invisible for the scorpions (MACHAN, 1968) to test whether males recognize females by detecting females' chemicals on the substrate or by visual cues. In all essays was used a clear glass round arena (12 cm in diameter; 7 cm height) with a filter paper as substrate. After each essay the arena was cleaned with alcohol 70% and the substrate was changed.

Chemical recognition

Chemical recognition experiments were based on GAFFIN AND BROWNNEL (1992) and TAYLOR *et al.* (2012). A total of 28 animals (14 females and 14 males) were used, totalizing 14 essays. In each essay, a female was trapped for 24h in a quadrant marked in the arena's bottom and walls, the substrate placed at the bottom of the arena. After this period, the female was removed from the arena and a male was placed on the opposite quadrant (Figure 1) right after. The male was trapped to acclimate for 5 min and then free to walk for 20 min. A control group was performed using 11 different males, where these animals were released on the arena with substrate no-exposed to females. The walking time in both groups were taped with a DSLR Nikon D5500 camera positioned above the arena. The videos were considered legitimated for analysis whether males crossed the opposite quadrant, where the female was before. Chemical recognition was considered whether male showed behavior alteration compared to control.

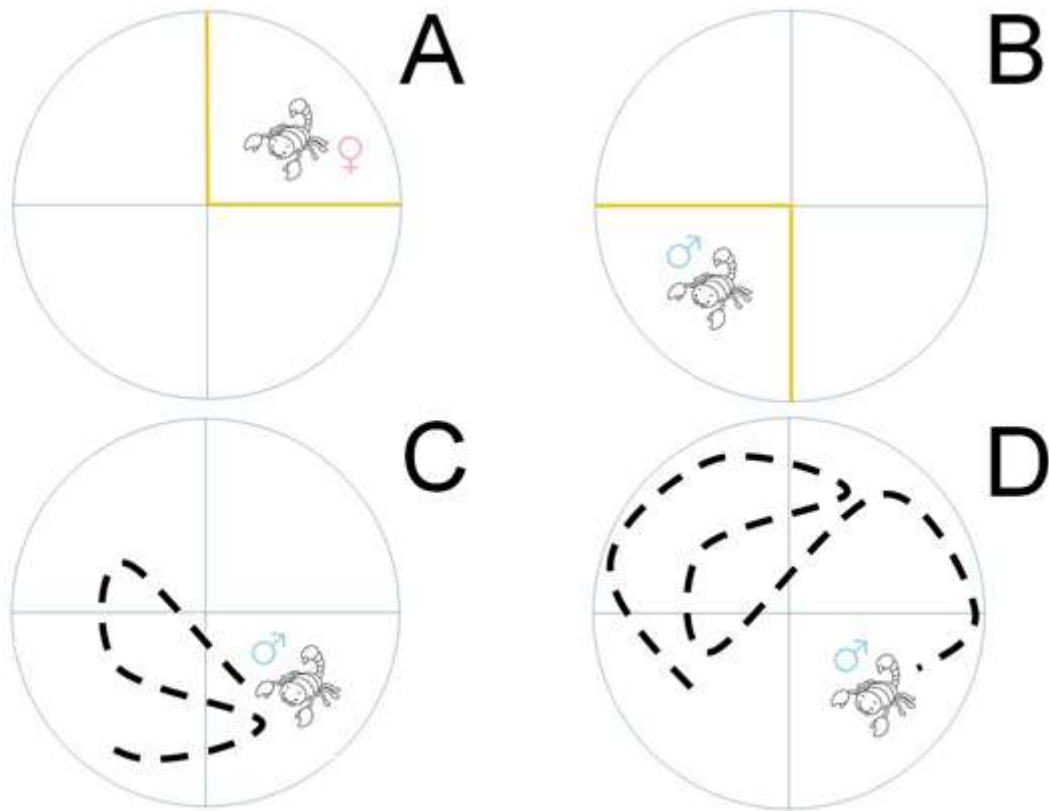


Figure 1. Diagram of the chemical recognition experiments. A – Female isolated in the quadrant for 24h. B – Male acclimating for 5 min. C – Invalid test. D – Valid test.

The videos were analyzed by a pair of researchers and scored 1-5 adapted from TAYLOR (2012) according to the following criteria: 1) no change in behavior, 2) slight change in behavior, such as, from erratic running and climbing, to walking after sudden stop, 3) back-up (an abrupt stop of forward motion followed by one or two steps backwards or slow move backwards and frontwards), 4) two three-score responses in the same quadrant, 5) three three-score responses in the same quadrant or pedipalp shaking (the pedipalp looks like vibrating in the air). The Wilcoxon signed-rank test was used to determinate if the treatments presented different behavior. Behavior alterations were based in comparison with

males' behavior placed in the arena containing clean substrates (without previous contact with females).

Visual recognition

To test if the males could recognize the female by sight, were used 30 animals (20 males and 10 females). Two types of experiments were conducted; the first consisted in monitoring males' behavior when placed in the presence of a female, couples ($n = 10$) were formed and placed, individually, in the arena, with a clean substrate. The interactions between each couple were monitored by sight for 20 min. Second, to verify whether the behavior was associated to female recognition or it was random, 10 paired males (five pairs) were marked and tested in two different conditions. Firstly, the paired males were individually placed in arenas with clean substrate and had their interactions monitored for 20 min. Secondly, substrates were previously prepared positioning two females in each for 24h. The males used in the first condition were placed in the arena containing the exposed substrate with the same male they have been exposed before. Their interactions were monitored for 20 min. No quadrants were used in the visual recognition experiments.

RESULTS

Chemical recognition

Males changed their behavior when in contact with the quadrant exposed to females. From 14 trials with exposed substrates, 10 were considered valid and nine out of 11 control videos were considered valid tests. The Wilcoxon signed-rank test showed that the males showed different behavior when with the exposed to female substrate ($Z = 2.8031$, $p = 0.0025$, one-tailed).

Changes in the behavior was characterized by stopping of climbing and running behavior, which was present in all control videos. The males with the exposed filter changed their behavior when trespassed the quadrant previously exposed to a female one to three times. The males stopped the climbing behavior and started to explore the arena for a while, apparently searching for the female; some of them seemed to quit the searching after some time and restarted the running and climbing behavior. Most of the males presented the score 5 (three three-score responses in the same quadrant or pedipalp shaking), which three presented the pedipalp shaking, and score 3 (abrupt stop, backwards steps or slow backwards and frontwards moves) (Table 2).

Table 2. Chemical recognition of females by *Tityus pusillus* males. Scores based on Taylor *et al.*, 2012.

With chemical sign		Control	
Male	Scores	Male	Scores
1	4	1	1
2	3	2	1
3	2	3	1
4	3	4	1
5	5	5	1
6	3	6	1
7	5	7	1
8	5	8	1
9	5	9	1
10	2		

Visual recognition

Under the conditions of the second experiment, males of *T. pusillus* showed no sign of female visual identification. In this set of experiments, the behavior of *T. pusillus* males was observed when facing females and other males. In the first situation analyzed, when a male was placed together with a female in the arena (n = 10 replicates), the presence of the did not make the male change their behavior in six out of 10 trials. Out of these six trials, in four both stayed still during the observation time, in one observation the male stayed still while the female dislocated and in one the female stayed still while the male dislocated. Dislocating or still, the female did not catch the male interest in these trials. In the other four out of 10 observations, in three observations the male only changed they behavior when the male stepped onto the female and in one case, the male stepped the path the female just did, thus changing his behavior and

demonstrated sexual interest. After stepping the female or her path, the males did the backup behavior and tried to engage the promenade à deux (Table 3).

Table 3. Behavior evaluation of visual female recognition by *Tityus pusillus* males

Couple	Initial behavior	Courtship behavior
1	Male running behavior	Yes, after male stepped on the female
2	No move	No, no encounter
3	Male running behavior	Yes, after male stepped on the female (copula)
4	Male running behavior	No, no encounter
5	Female running behavior	No, no encounter
6	Female running behavior	Yes, after male stepped on female trail
7	No move	No, no encounter
8	No move	No, no encounter
9	No move	No, no encounter
10	Female and male running behavior	Yes, after male stepped on the female (copula)

In the second situation, when a male was placed together with another male and the clean substrate (n = 5 replicates, 10 males observed), no male changed his behavior. In all the trials, the males encountered each other several times, but both males ignored each other in all observations. All males stayed still or running and climbing the arena walls for the 20 min observation (Table 4). When using the same male pairs with the exposed to a female substrate, on the third situation, the males started to show the behavior alterations observed in the chemical recognition test as soon as they were put on the arena. All the males seemed to be interested in each other after a first encounter. In this situation, in two observations the males gave up mutually to try to engage the promenade à deux after some dispute over the control of the courtship. In others two observations, one of the males gave up the courtship and the other did not, resulting in violent refuses. In the last observation, the males insisted with the

courtship, engaged the promenade a deux and one of the males finished the courtship depositing the spermatophore on the paper (Figure 2).

Table 4. Behavior of *Tityus pusillus* males in substrate with and without previous exposure to females

Male pair	With female exposure	Behavior	Without female exposure	Behavior
1	Mutual interest.	Mutual dropout.	They ignored each other.	Several encounters and no behavior alteration.
2	Mutual interest.	PMD with spermatophore deposition.	They ignored each other.	Occasional encounters and no behavior alteration.
3	Mutual interest.	Mutual dropout.	They ignored each other.	One still and one walking, occasional encounters and no behavior alteration.
4	Mutual interest.	One male dropout with violent fights as result.	They ignored each other.	One still and one walking, occasional encounters and no behavior alteration.
5	Mutual interest.	One male dropout with violent fights as result.	They ignored each other.	Several encounters and no behavior alteration.



Figure 2. *Tityus pusillus* males mistaking one another for a female and trying to copulate after exposition to a substrate previously exposed to females. Setae indicates the spermatophore deposited by one of them.

DISCUSSION

The fact that the female is present does not seem to trigger the courtship behavior, unless the male feels the chemical sign on the ground or in the female herself, suggests that *T. pusillus* males recognize the females using chemical signs left by them on the ground. Our findings are in agreement with some other scorpion species findings, in which chemical and behavioral evidence also suggests that courtship behavior seems to be mediated by chemical cues (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, MELVILLE *et al.*, 2003, STEINMETZ *et al.*, 2004, TAYLOR *et al.* 2012).

The *T. pusillus* males weren't attracted directly to the exposed quadrant and did not show direction preferences dislocating in the arena. *T. pusillus* demonstrated a similar behavior described by TAYLOR *et al.* (2012), where *Paruroctonus utahensis* Williams, 1968, was not attracted directly to the quadrant containing the female cuticle extract, nor demonstrated preference for any directions when dislocating, suggesting that the chemical signs left from the female weren't volatile. This suggests that cuticle chemical signs from the *T. pusillus* females are not volatile also. STEINMETZ *et al.* (2004) also reports that *Centruroides vittatus* Say, 1863, cannot perceive air borne female chemical signs, the males perceive the chemicals only when laying on the ground. Although the way how *T. pusillus* recognizes the chemicals in the ground is unknown, it is possible that males are reacting to a compound from the female cuticle, identified by the pecten as in other scorpion species like *Smerigurus mesaensis* Stahnke, 1957, *P. utahensis*, *H. arizonensis* and *C. vittatus* males

would detect the females' chemicals signs with the pecten (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, MELVILLE *et al.*, 2003, STEINMETZ *et al.*, 2004, TAYLOR *et al.* 2012). The pecten is a structure located ventrally on the scorpions, in the mesosoma. (HJELLE, 1990). This structure contains a great quantity of chemoreceptors and is constantly sweeping the ground (GAFFIN AND BROWNELL, 1997). In literature, there are registry of the increase of the pecten activity in the presence of females' chemical cues in the scorpion *S. mesaensis* (GAFFIN AND BROWNELL, 1992). POLIS AND SISSOM (1990) suggests that the presence of court initiation with the presence of chemicals mediators would be linked to scorpion species with low density population, but that's not the case with *T. pusillus*, as it is the most abundant species in Brazilian northeast Atlantic forest (LIRA *et al.*, 2015). In addition, was observed that the *T. pusillus* females' chemicals can be stable, as it was observed males demonstrating the courtship behavior when contained in old females' habitats. Those habitats had been washed, cleaned and stored weeks before; therefore, males would still react to them. TAYLOR *et al.* (2012) also observed that the compounds could be stable, as it was observed that the males of *P. utahensis* would still react to the female compounds even after the chemicals been stored for three months.

Concerning the visual recognition, although ALEXANDER (1959) has suggested that some scorpion species, like *Tityus trinitatis* Pocock, 1897, recognize their sexual partners through morphologic differences and contact, it is not the case for most literature records (GAFFIN AND BROWNELL, 1992, MELVILLE *et al.*, 2003, STEINMETZ *et al.*, 2004, TAYLOR *et al.* 2012). The results found in the trials to detect males' ability to detect females by seeing, shows that the males can't recognize females by seeing or touching them. Males

T. pusillus did not show any interest in females walking around the arena or standing still. The only situation where the male demonstrated interest in the female was when the male stepped upon the female, which the occurrence seemed to be random. Experiments with *Centruroides margaritatus* Gervais, 1841 during courtship only detected substrate vibrations coming from the male, probably used to communicate to the female the intention of courtship (BRICEÑO AND BONILLA, 2009). Although the males haven't showed interest for each other when placed in the clean substrate, it does mistake another male as a female when in the substrate with female's chemical signs. As soon as deposited in the substrate exposed to female's, the males started the behavior pattern found in the chemical detection trials after detecting the female chemical in the quadrant. They pursued the courtship even after contact, culminating on the spermatophore deposition in one observation. The cuticle fluorescent properties have been suggested as a recognition mechanism, mainly for mating season (BROWNELL, 2001), but males and females probably do not have differences in the fluorescence specter, as demonstrated by KLOCK, (2008) for two scorpion species. The fact that males cannot recognize females by seeing them are reinforced by the register that scorpions have low visual perception, differentiating mostly the presence and absence of light (LOCKET, 2001).

In conclusion, our findings show that *T. pusillus* males courtship behavior is mediated by chemical cues left on the ground by females. Also, that males cannot distinguish another male from females visually. This work represents the first record of chemical signs for female recognition in *T. pusillus*, as well the first record of chemical signs for tropical forest scorpions. In addition, it also refers to the second record of chemical signaling for the Buthidae family, along with *C.*

vittatus (STEINMETZ *et al.*, 2004). Furthermore, contributes to the knowledge of conspecifics mate recognition in scorpions. Studies on the chemical recognition in scorpions are still few, especially for forest species. This path is a wide area to be explored and needed to the understanding and expansion of the order Scorpiones knowledge.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, A. J. Courtship and mating in the buthid scorpion. *Proc. Zool. Soc.* 133, 145-169, 1959.

BRICEÑO, R. D.; BONILLA, F. Substrate vibrations in the scorpion *Centruroides margaritatus* (Scorpiones: Buthidae) during courtship. *Rev. Biol. Trop.* v. 57, n. 1, p. 267-274, 2009.

BROWNELL, P.; GAFFIN, D. D. Scorpions Biology and Research. Oxford University Press. 544p, 2001.

BROWNELL, P. H. Sensory ecology and orientational behaviors. In: Brownell P., Polis G. A., Scorpion biology and research. Oxford University Press, p. 159-183, 2001.

GAFFIN, D. D.; BROWNELL, P. H. Evidence of chemical signaling in the sand scorpion, *Paruroctonus mesaensis* (Scorpionida: Vaejovida). *Ethology*, v. 91, n. 1, p. 59-69. 1992.

- GAFFIN, D. D.; BROWNELL, P. H. Response properties of chemosensory peg sensilla on the pectines of scorpiones. *J. Comp. Physiol. A*, v. 181, p. 291-300, 1997.
- GREENFIELD M. D. Signalers and Receivers: Mechanisms and Evolution of Arthropod Communication. New York, NY: Oxford University Press, 2002.
- HJELLE, J. T. Anatomy and morphology. In POLIS, G. A., The Biology of Scorpions, Stanford University Press, p. 9-63, 1990.
- KLOOCK, C. T. A comparison of fluorescence in two sympatric scorpion species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 91, 2008.
- LEWIS, S. L.; LLOYD, J.; SITCH, S.; MITCHARD, E. T. A.; LAURANCE, W. F. Changing ecology of tropical forests: evidence and drivers. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, v. 40, 529–549, 2009.
- LIRA, A. F. A.; DE SOUSA, A. M.; SILVA FILHO, A. A. C.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Spatio-temporal microhabitat use by two co-occurring species of scorpions in Atlantic rainforest in Brazil. *Zoology*, v. 116, p. 182– 185, 2013.
- LIRA, A. F. A.; REGO, F. N. A. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. How important are environmental factors for the population structure of co-occurring scorpion species in a tropical forest?. *Can. J. Zool.*, v. 93, p. 15-19, 2015.
- LOCKET, A. Eyes and vision. In: Brownell P., Polis G. A., Scorpion biology and research. Oxford University Press, p. 79–106, 2001.
- LOURENÇO, W. R. Scorpions of Brazil. Les Édition de l'If, Paris. 308p, 2002.

- MACHAN, L. Spectral sensitivity of scorpion eyes and the possible role of shielding pigment effect. *Journal of Experimental Biology*, v. 49, n. 1, p. 95-105, 1968.
- MELVILLE, J. M.; TALLAROVIC, S. K.; BROWNELL, P. H. Evidence of mate trailing in the giant hairy desert scorpion, *Hadrurus arizonensis* (Scorpionida, Iuridae). *Journal of insect behavior*, v. 16, n. 1, p. 97-115, 2003.
- POLIS, G. A.; FARLEY, R. D. Behaviour and ecology of the cannibalistic scorpion, *Paruroctonus mesaensis* Stahnke (Scorpionida: Vaejovidae). *J. Arachnol.*, v. 7, p. 33-46, 1979.
- POLIS, G. A. The biology of scorpions. Stanford University Press. 587p, 1990.
- POLIS, G. A.; SISSOM, W. D. Life history. In POLIS, G. A., The biology of scorpions. Stanford University Press, p. 161-223, 1990.
- STEINMETZ, S. B.; BOST, K. C.; GAFFIN, D. D. Response of male *Centruroides vittatus* (Scorpiones: Buthidae) to aerial and substrate-borne chemical signals. *Euscorpius*, v. 12, p. 1-6, 2004.
- STOCKMANN, R.; YTHIER, E. Scorpions of the World. Paris: NAP editions. 2010.
- TAYLOR, M. S.; COSPER, C. R.; GAFFIN, D. D. Behavioral evidence of pheromonal signaling in desert grassland scorpions *Paruroctonus utahensis*. *Journal of Arachnology*, v. 40, n. 2, p. 240-244, 2012.
- TRABALON, M.; BAGNÈRES, A. G. Contact recognition pheromones in spiders and scorpions. In G.J. BLOMQUIST, A. G. BAGNÈRES, *Insect Hydrocarbons:*

Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology. Cambridge University Press, p. 344-375, 2010.

CONCLUSÕES

Apesar do dimorfismo sexual e entre os machos, este fator não interfere no comportamento de corte de *T. pusillus*. Corroborando com os dados mais atuais sobre os escorpiões, o comportamento de corte em *T. pusillus* é motivado por sinais químicos, não tendo os sinais visuais sido relacionados a esse comportamento.