



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE ARAÑAS MIGALOMORFAS (ARANEAE,  
MYGALOMORPHAE): PATRONES Y MECANISMOS DE SELECCIÓN SEXUAL

María Sofía Copperi

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados II dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Universidad Nacional del Sur y al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el periodo entre septiembre de 2013 y febrero de 2018 bajo la dirección de la Dra. Adriana Alicia Ferrero (UNS- INBIOSUR) y el Dr. Alfredo Vicente Peretti (Universidad Nacional de Córdoba)

Licenciada María Sofía Copperi



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ....., mercedo

La calificación de ..... (.....)

## Agradecimientos

*En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, Dr. Alfredo Peretti y Dra. Adriana Ferrero por haberme guiado a lo largo de estos años y permitirme poder realizar este trabajo bajo su dirección.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de la beca de posgrado.*

*Al INBIOSUR, (Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur) por brindarme un espacio de trabajo. A las secretarias del Instituto, Natalia y Patricia por estar siempre dispuestas a solucionar cualquier contratiempo.*

*Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, por aceptarme como alumna de posgrado y posibilitar que esta tesis se lleve a cabo.*

*Agradecer al Laboratorio de Zoología de Invertebrados II, lugar donde a partir del 2008 fue mi espacio de trabajo, de aprendizaje y convivencia con un gran grupo de gente. A las personas que compartieron mis días en él, Adriana, Mercedes, Patricia, Jorge, Natalia, Verónica, Carolina, Noelia y a las que también se le sumaron las tardes y noches, Sabri, Emi y Chino.*

*Agradecimientos aparte a mi grupo de Aracnología, Nelson, Gabriel y Leonela, no solo por tantos kilómetros recorridos y piedras levantadas, también por las risas, la compañía y las masitas con paté.*

*A Nelson por abrirme la puerta del laboratorio y permitirme adentrarme a este fantástico mundo de las arañas, por confiar en mí y acompañarme en todo este largo proceso, desde el momento que surgió entre mates y tarántulas la idea del doctorado hasta el día de hoy.*

*A toda la gente Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución del Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), Córdoba, por su apoyo, ayuda y compañía durante estos 5 años. En especial a David y Franco por ayudarme durante mis pasantías allí.*

*A la Dra. Elena Galindez y la Lic. Anahi Wehitt del laboratorio de Histología del INBIOSUR, por su colaboración con la preparación y análisis de cortes histológicos. A la Dra. Alejandra Minetti de Toxicología INBIOSUR, por permitirme utilizar elementos de su laboratorio.*

*A mis amigas, Lu, Carli, Poly y Flor, por su aguante, compañía, charlas infinitas y una vida y más de amistad.*

*A Meli y Nico, por su existencia misma... que nunca se termine las ganas de reírnos y arder en el infierno.*

*A Juli más que hospedaje en estos años me diste una amiga, terapia en momentos de crisis y apoyo durante estos mutuos años de tesis. Clari por tus charlas, consejos y compañía.*

*A toda mi familia gracias tremendas por todos estos años de apoyo incondicional, aunque todavía no entienden bien que es lo que hago ellos siempre están ahí para todo.*

*A Gaby por la amistad, compañía, apoyo y aguante durante toda la tesis y en especial la paciencia durante el tramo final.*

*Y a Matilde, mi eterna, fiel y peluda compañera...*

Cuando Darwin postuló la teoría de Selección Sexual pudo explicar elaboradas características presentes normalmente en los machos que no podía predecir con la teoría de Selección Natural. Bajo esta teoría predijo que en general las hembras tenderán a ser el sexo selectivo y recurso escaso por el cual compiten los machos. Los arácnidos ofrecen un interesante modelo sexual entre los artrópodos para analizar procesos de selección sexual post-cópula como elección femenina y competencia espermática. Las arañas migalomorfas poseen caracteres plesiomórficos, por lo que el estudio en este grupo constituye un punto inicial para formular hipótesis evolutivas de comportamiento. Como objetivo general de la presente tesis se propone interpretaciones evolutivas para los patrones observados en el comportamiento sexual y estructuras reproductivas, comparando los datos obtenidos en las tarántulas *Grammostola vachoni* Schiapelli & Gerschman, 1961, *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman, 1942) y la nemésida *Acanthogonatus centralis* Goloboff, 1995 con los registrados en otras especies para contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de los arácnidos.

A partir de los resultados obtenidos, se amplía el conocimiento sobre los ciclos de vida y patrones de cortejo y cópula de las tres especies modelo. Con respecto a los estudios de comunicación química se halló que entre machos y hembras de *A. centralis* y *P. longisternale* no intervienen señales químicas aéreas pero sí señales quimio-táctiles en la tela de las hembras que disparan el cortejo de los machos. Además los machos de *A. centralis* han desarrollado la capacidad de diferenciar entre las hembras y que éstas pueden advertir sobre su estatus reproductivo y receptividad.

En relación al estudio de la transferencia de esperma en *A. centralis*, no se encontró relación entre la duración de la cópula con la cantidad de esperma almacenado por la hembra así como tampoco con el remanente en los bulbos de los machos. No obstante, existiría un mayor control interno del almacenado de esperma por parte de la hembra, así como también una amplia comunicación de la pareja previa a la cópula y posterior a ella. Por medio de este trabajo se pudo confirmar la existencia de dimorfismo sexual en el tamaño corporal de las tres especies, además las hembras de *A. centralis* poseen mayor porcentaje de grasas e índice corporal que los machos, aunque se encontraron iguales porcentajes de musculatura en patas. Pero las hembras de *A. centralis* y *G. vachoni*, no mostraron superior inmunidad que los machos frente a un agente extraño. Por último con respecto a las variaciones entre las poblaciones de las arañas estudiadas, en las tarántulas *P. longisternale* y *G. vachoni* no se observaron diferencias en su repertorio de cortejo. En cambio *A. centralis* mostró un inicio de aislamiento reproductivo, que estaría en diferentes fases según la población. Los estudios realizados en estas arañas muestran que, pese a las dificultades que el grupo posee, interesantes patrones y mecanismos están presentes y son posibles de estudiar, brindando características de un grupo basal que ayudaría a entender la evolución de un clado más grande.

# Abstract

When Darwin proposed the theory of Sexual Selection has been able to explain the elaborated traits present in males who cannot be explained with the Natural Selection theory. Under this theory, he predicted that in general females will tend to be the selective sex and a limited resource for which males compete. Arachnids are an interesting sexual model among arthropods to analyze post-copula process of sexual selection such as female choice and sperm competition. Mygalomorph spiders have plesiomorphic traits, so, the study of this group of spiders constitutes the starting point to formulate evolutionary hypothesis of behavior. As a general objective of the present thesis, evolutionary interpretations for the observed patterns in sexual behavior and reproductive structures were proposed, comparing the data obtained in the tarantulas *Grammostola vachoni* Schiapelli & Gerschman, 1961, *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman, 1942) and the nemesid *Acanthogonatus centralis* Goloboff, 1995 with the registered in other species to contribute to the knowledge of the reproductive biology of arachnids.

Based on the results obtained, the knowledge of the life cycles and courtship and copula patterns of the three model species were broadened. Regarding to chemical communication studies, the results showed that there were no aerial chemical signals between males and females, but there were chemotactic signals that triggered the courtship in males. In addition, males of *A. centralis* have developed the ability to differentiate between females and this ability could use to inform them about the reproductive status and receptivity of the females. In relation to the sperm transfer

study in *A. centralis*, no relationship was found between copula duration and the amount of sperm stored, or with the remained in the male's bulbs. However, there would be a higher internal control of the sperm storage by the female, as well as broad communication of the couple before and after the copula. Through this thesis it was possible to confirm the existence of sexual dimorphism in the body size of the three species. In addition, females of *A. centralis* have a higher percentage of fats and body index than males, although similar percentages of musculature in legs were found. Females of *A. centralis* and *G. vachoni* did not show higher immunity than males against a foreign agent. Finally, regarding the variations between populations of the spiders studied, in the tarantulas *P. longisternale* and *G. vachoni* no differences were observed in their courtship repertoire. Contrarily, *A. centralis* showed a beginning of reproductive isolation, which would be in different phases according to the population. The studies carried out in these spiders showed that, despite the difficulties that this particular group of spiders has, interesting patterns and mechanisms are present and are possible to study, providing characteristics of a basal group that would be help to understand the evolution of a large clade.

<b>PREFACIO</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
<i>Selección sexual</i>	2
<i>Selección sexual post-cópula</i>	3
<i>Selección sexual en arácnidos</i>	4
<i>Las arañas como modelos de selección sexual</i>	4
<i>Arañas Migalomorfas</i>	5
<b>OBJETIVOS</b>	8
<b>CAPÍTULO I: BIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO</b>	
1. Introducción	11
2. Objetivos	19
3. Materiales y Métodos	20
3.1. <i>Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio</i>	20
3.2. <i>Ciclo de vida, desarrollo y maduración</i>	20
3.2.1. <i>Historia Natural</i>	20
3.2.2. <i>Maduración</i>	21
3.3. <i>Descripción de cortejo y cópula</i>	21
4. Resultados	22
4.1. <i>Historia Natural</i>	22
<i>Plesiopelma longisternale</i>	22
<i>Grammostola vachoni</i>	23
<i>Acanthogonatus centralis</i>	25
4.2. <i>Maduración</i>	26
4.3. <i>Cortejo y Cópula</i>	29

<i>Plesiopelma longisternale</i>	29
<i>Grammostola vachoni</i>	32
<i>Acanthogonatus centralis</i>	34
5. Discusión	37
5.1. Historia Natural	37
5.2. Maduración	38
5.3. Cortejo y Cópula	39
5.4. Cortejo, estructuras y su funcionalidad	41

## CAPÍTULO II: COMUNICACIÓN INTERSEXUAL A NIVEL QUÍMICO

1. Introducción	45
2. Objetivos	50
3. Materiales y Métodos	52
3.1. <i>Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio</i>	52
3.2. <i>Criterios generales de las experiencias</i>	52
3.3. <i>Diseño de experimentos</i>	53
3.3.1. <i>Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles</i>	53
<i>Feromonas volátiles presentes en la cutícula de las hembras de A. centralis</i>	54
<i>Feromonas volátiles presentes en la tela de las hembras de A. centralis</i>	54
3.3.2. <i>Prueba de existencia de feromonas femeninas de contacto en A. centralis</i>	55
3.4. <i>Análisis estadísticos</i>	57
4. Resultados	58
4.1. <i>Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles</i>	58
4.1.1. <i>Feromonas volátiles presentes en la cutícula de las hembras de A. centralis</i>	58
4.1.2. <i>Feromonas volátiles presentes en la tela de las hembras de A. centralis</i>	60
4.2. <i>Prueba de existencia de feromonas femeninas de contacto en A. centralis</i>	62

## **Datos complementarios**

<i>Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles y de contacto en Plesiopelma longisternale</i>	67
5. Discusión	70

## **CAPÍTULO III: TRANSFERENCIA DE ESPERMA**

1. Introducción	76
2. Objetivos	83
3. Materiales y Métodos	84
3.1. <i>Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio</i>	84
3.2. <i>Criterios generales de las experiencias</i>	84
3.3. <i>Cuantificación de esperma</i>	85
3.3.1. <i>Preparación de la soluciones para conteo de esperma</i>	85
3.3.2. <i>Diseción de ejemplares y conteo de espermatozoides</i>	85
3.3.3. <i>Número de espermatozoides por cápsula</i>	86
3.3.4. <i>Criterio para la virginidad de las hembras</i>	86
3.4. <i>Diseño de los experimentos</i>	87
3.4.1. <i>Cuantificación general del número de espermatozoides</i>	87
3.4.2. <i>Duración de cópula y cuantificación del esperma</i>	88
3.4.3. <i>Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma</i>	88
3.5. <i>Análisis estadísticos</i>	88
4. Resultados	90
4.1. <i>Cópulas</i>	90
4.2. <i>Cuantificación general del número de espermatozoides</i>	90
4.3. <i>Duración de cópula y cuantificación del esperma</i>	92
4.4. <i>Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma</i>	93
5. Discusión	96
5.1. <i>Duración de cópula y cuantificación del esperma</i>	96
5.2. <i>Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma</i>	99

## CAPÍTULO IV: DIMORFISMO SEXUAL NO APARENTE

1. Introducción	105
2. Objetivos	111
3. Materiales y Métodos	112
3.1. <i>Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio</i>	112
3.2. <i>Diseño de los experimentos</i>	112
3.1.1. <i>Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal</i>	112
3.1.2. <i>Cálculo de contenido de grasas y músculo                 e índice de condición corporal</i>	113
3.1.3. <i>Respuesta inmune</i>	114
3.3. <i>Análisis estadísticos</i>	114
4. Resultados	116
4.1. <i>Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal</i>	116
4.2. <i>Cálculo de contenido de grasas y músculo e índice de condición corporal</i>	116
4.3. <i>Respuesta inmune</i>	116
5. Discusión	118
5.1. <i>Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal</i>	118
5.2. <i>Cálculo de contenido de grasas y músculo e índice de condición corporal</i>	120
5.3. <i>Respuesta inmune</i>	121

## CAPÍTULO V: UNA PRIMERA APROXIMACIÓN AL COMPORTAMIENTO SEXUAL INTERPOBLACIONAL

1. Introducción	125
2. Objetivos	129
3. Materiales y Métodos	130
3.1. <i>Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio</i>	130
3.2. <i>Criterio de observación de secuencias de comportamiento y cópula</i>	132
3.3. <i>Diseño de los experimentos</i>	132

3.3.1. Cortejo masculino sobre telas de hembras a nivel intra e inter-poblacional en <i>Acanthogonatus centralis</i>	132
3.3.2. Interacciones sexuales en <i>Plesiopelma longisternale</i>	133
3.3.3. Interacciones sexuales complementarias en <i>Grammostola vachoni</i>	134
3.4. Análisis estadísticos	134
4. Resultados	136
4.4. Cortejo masculino sobre telas de hembras a nivel intra e inter-poblacional en <i>Acanthogonatus centralis</i>	136
4.5. Interacciones sexuales en <i>P. longisternale</i>	137
4.6. Interacciones sexuales complementarias en <i>Grammostola vachoni</i>	139
5. Discusión	141
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	144
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	148

# Introducción General

## Selección sexual

Cuando Darwin postuló la teoría de Selección Natural no pudo explicar elaboradas características presentes normalmente en los machos, que a diferencia de lo esperado bajo su teoría, exponían a los individuos ante depredadores. Fue entonces cuando propuso que el cortejo, los colores intensos, plumas o aletas brillantes, cantos, cuernos y astas de los machos habían sido seleccionadas por su importancia en la competencia por parejas y no para lograr una mayor supervivencia (Darwin 1871).

A esto lo llamó Selección Sexual y contestó con ella tres importantes preguntas: ¿porqué hay tantas diferencias entre ciertos machos y hembras?, ¿Cómo se explican las características exageradas de los machos? y ¿Cómo se explica la existencia de caracteres que parecen ser negativos con la supervivencia? (Huber 2005). Hoy en día se considera a la Selección Sexual (Andersson 1994; Eberhard 2009a) como la fuerza evolutiva que surge en consecuencia de las diferencias en éxito reproductivo, producto de la competencia por el acceso a parejas y gametos.

Para explicar el origen y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (estructuras relacionadas con el éxito de la reproducción de manera indirecta), Darwin describió como mecanismos de selección sexual a la competencia para obtener pareja (principalmente entre machos) y la elección de pareja (ejercida principalmente por las hembras) (Darwin 1871), ambos comportamientos previos a la cópula.

Uno de los principales postulados de la teoría de Selección Sexual predice que en general las hembras tenderán a ser el sexo selectivo y recurso escaso por el cual compiten los machos. Esto se debe principalmente a que las hembras poseen pocos gametos grandes y costosos, y los machos en cambio producen muchos gametos

pequeños (Parker 1970). Tradicionalmente, esta asimetría en el tamaño de los gametos determinará la dirección e intensidad con la que operará la Selección Sexual sobre cada sexo (Andersson 1994). Dentro de este contexto, surgirán la cooperación y conflictos intra e intersexuales en lo que respecta a decisiones de apareamiento y cuidado parental (Arnqvist & Rowe 2005; Krebs & Davies 1996).

### Selección sexual post-cópula

Desde la década del '70 una nueva faceta de la selección sexual se comenzó a estudiar con la inclusión de mecanismos de selección post-cópula (Eberhard 1996; Parker 1970; Simmons 2001; Thornhill 1983). La competencia espermática y la elección críptica femenina, ambos mecanismos de selección sexual post-cópula se tomaron como equivalentes a los mecanismos propuestos por Darwin en pre-cópula, competencia macho-macho y elección de la hembra respectivamente.

La competencia espermática ocurre en particular si el esperma de cópulas consecutivas se almacena en el mismo sitio antes de ser usado y se define como la competencia entre los eyaculados de diferentes machos por el acceso a la fertilización de un determinado set de óvulos (Birkhead & Møller 1998; Parker 1970; Simmons 2001). Esta forma de competencia es un fenómeno distribuido taxonómicamente, donde el retraso entre la inseminación y la fertilización crea condiciones bajo las cuales el esperma almacenado en regiones especializadas de la hembra puede interactuar y competir (Birkhead & Møller 1998). También se puede mencionar la capacidad que poseen algunas hembras de seleccionar entre el esperma de diferentes machos y favorecer la paternidad de algunos en detrimento de otros, antes y durante la cópula por medio de la elección críptica femenina (Eberhard 1985, 1996, 2009a;

Pizzari & Birkhead 2000). Las hembras pueden activamente influir en la fertilización por medio de aceptar, almacenar y utilizar diferencialmente el espermatozoides de cierto macho (Pizzari & Birkhead 2000; Thornhill 1983).

En la actualidad las bases de la teoría de la selección sexual están atravesando replanteamientos conceptuales drásticos (Peretti & Aisenberg 2011). El peso de los procesos de competencia entre machos y elección femenina está siendo re-evaluado (Gavrilets *et al.* 2001; Peretti & Aisenberg 2011).

### Selección sexual en arácnidos

Los arácnidos ofrecen un interesante modelo sexual entre los artrópodos para analizar procesos de elección femenina y competencia espermática. La mayoría exhibe un cortejo muy complejo en el que participan señales de reconocimiento, de excitación sexual y también de apaciguamiento (Eberhard 2004). A este cortejo le sigue una etapa de transferencia espermática, que según el Orden taxonómico, se realiza por medio de un espermátforo, estructuras copulatorias especiales del macho, o bien mediante un pene. En la Clase Arachnida, en especial en arañas y escorpiones (ej.: Eberhard 2004; Peretti & Eberhard 2010) actualmente se profundiza el estudio de los comportamientos y/o genitalia masculina que evolucionaron bajo presión selectiva de pautas de elección femenina (Eberhard 1996) o bien por coevolución antagonista (Chapman *et al.* 2003).

### Las arañas como modelos de selección sexual

El grupo de las arañas comprende más de 4000 géneros y 47000 especies (World Spider Catalog, 2018) que presentan una gran variedad de estrategias reproductivas y comportamientos reproductivos, las cuales en muchos casos son fácilmente observados y cuantificados, lo que las convierte en un excelente modelo

para estudios de selección sexual. Las arañas cuentan con genitalia doble y bilateralmente simétrica en ambos sexos, permitiendo la utilización del mismo animal como experimento y control (ej.: Eberhard & Huber 2010; Uhl 2000). Además gracias a la morfología genital de los machos es posible realizar cuantificaciones de esperma, incluyendo estudios con esperma en forma pura luego de una inducción espermática (ej.: Albo *et al.* 2013; Snow & Andrade 2004). Las arañas también poseen una amplia variedad de posiciones copulatorias que permiten la observación adecuada del proceso copulatorio y mecanismos de movimientos de la genitalia masculina que permiten determinar y cuantificar las eyaculaciones, movimientos de palpos, formación de tapones copulatorios, entre otros (ej.: Bertani *et al.* 2008; Eberhard & Huber 1998; Uhl *et al.* 2014). Además de tácticas como el dimorfismo sexual extremo (Foellmer & Fairbairn 2005), la inversión de roles sexuales (Aisenberg & Costa 2008), el canibalismo sexual (Sentenská & Pekár 2014) y los regalos nupciales (Albo *et al.* 2011) entre otras, que proporcionan un abanico de preguntas muy extenso.

### Arañas Migalomorfas

Aunque la creciente cantidad de estudios sobre biología de arañas permite la comparación e interpretación de resultados en un marco más amplio de discusión, la mayoría de estos estudio se ha enfocado mayoritariamente a las arañas del Infraorden Araneomorphae (Burger *et al.* 2010; Costa-Schmidt *et al.* 2017; Huber 2005; Schneider & Lubin 1998), mientras que los estudios en Mygalomorphae son escasos (ver Ferretti *et al.* 2013a). Las arañas migalomorfas poseen caracteres plesiomórficos, por lo que el estudio en este grupo constituye un punto inicial para formular hipótesis evolutivas de comportamiento. Las migalomorfas poseen características biológicas particulares

entre las arañas, algunas especies pueden vivir entre 15 y 30 años y pueden demorar entre cinco y siete años en alcanzar la madurez sexual (Main 1978). A diferencia de la mayoría de las Araneomorfas, este grupo tiene la particularidad que las hembras una vez alcanzada la madurez sexual siguen mudando y creciendo, los machos presentan como forma de transferencia de esperma la coenospermia y su limitada dispersión las convierte en especies agregadas y con altas tasas de endemismos (Ferretti *et al.* 2014a; Foelix 2011; Michalik & Ramírez 2014; Raven 1985). El número de estudios en comportamiento sexual en las arañas migalomorfas se ha incrementado en los últimos años (ver Costa-Schmidt *et al.*, 2017), aunque generalmente los trabajos son enfocados sólo a la familia Theraphosidae. Estos estudios han revelado mecanismos de comunicación sexual complejos (Quirici & Costa 2005) y morfología genital femenina variada (Bertani *et al.* 2002; Michalik *et al.* 2005) a pesar de hipótesis previas sobre la simplicidad del comportamiento sexual de estas arañas (Platnick 1971).

Las tarántulas *Grammostola vachoni* Schiapelli & Gerschman, 1961, *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman, 1942) y la nemésida *Acanthogonatus centralis* Goloboff, 1995, son arañas migalomorfas con una amplia distribución en las sierras centrales de la Argentina (Ferretti *et al.* 2012b, 2014c; Goloboff 1995), de las cuales el conocimiento tanto de su biología reproductiva como parámetros ecológicos fueron abordados en los últimos años con mayor interés (Copperi *et al.* 2012; Costa & Pérez-Miles 1992, 2002; Ferretti *et al.* 2011; Ferretti & Ferrero 2008), sin embargo estudios enfocados bajo la lupa de la selección sexual son nulos en estas especies.

Por lo mencionado, la presente tesis doctoral contribuye sustancialmente al conocimiento de la biología reproductiva de estas tres especies de arañas migalomorfas y de los procesos de selección sexual que subyacen en este grupo. Así

como también aporta al mejoramiento y/o desarrollo de teorías explicativas, aplicables a otros artrópodos.

## Objetivos Generales

- Contribuir al escaso conocimiento actual de la biología reproductiva de las arañas Mygalomorphae bajo hipótesis de selección sexual.
- Proponer interpretaciones evolutivas para los patrones observados en el comportamiento sexual y estructuras reproductivas, comparando los datos obtenidos con los registrados en otras especies para contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de los arácnidos.

## Objetivos Específicos

- Describir los patrones de cortejo y cópula así como el sistema de apareamiento predominante en *Grammostola vachoni*, *Plesiopelma longisternale* y *Acanthogonatus centralis*.
- Precisar ciclos de vida y datos de la biología de *Grammostola vachoni*, *Plesiopelma longisternale* y *Acanthogonatus centralis*.
- Analizar la existencia de comunicación química intersexual mediante la presencia de feromonas volátiles y/o de contacto a través de evidencias comportamentales en *Plesiopelma longisternale* y *Acanthogonatus centralis*.
- Identificar qué influencia tienen sobre la transferencia y almacenamiento de esperma las principales conductas de cortejo y cópula en *Acanthogonatus centralis*.

- Estimar la existencia del dimorfismo sexual en cuanto al tamaño en las tres especies, contenido de grasas y musculatura en *Acanthogonatus centralis* y capacidad de respuesta inmune genérica en *A. centralis* y *Grammostola vachoni*.
- Conocer el comportamiento sexual y el grado de inter-cruzamiento en dos poblaciones de las tres especies de Mygalomorphae seleccionadas.

Capítulo I

# Biología y Comportamiento Reproductivo

## 1. Introducción

Las arañas son siempre dioicas; es decir, tienen siempre sexos separados y sus órganos sexuales internos, testículos y ovarios, yacen como estructuras de a pares dentro del abdomen (Foelix 2011). Los óvulos y espermatozoides son liberados al exterior en ambos sexos a través del surco epigástrico situado entre y ligeramente atrás de los pulmones en libro. Los machos de las arañas perdieron su órgano copulador primario, por lo que sus pedipalpos han sido modificados para transferir el esperma (Foelix 2011). Durante el periodo reproductivo los machos realizan la búsqueda de pareja, luego del encuentro son ellos los que comienzan a intercambiar señales a través de intrincados cortejos (en la mayoría de los casos, excepciones ver Aisenberg *et al.*, 2009). El cortejo puede definirse como patrones comportamentales ritualizados que anteceden a la cópula. Dentro de las hipótesis que explican las funciones del cortejo podemos enumerar el reconocimiento de especies, supresión de la agresión femenina, la estimulación de la hembra para que copule, evaluación de la calidad masculina y sincronización del comportamiento reproductivo (Wignall & Herberstein 2013). Según Platnick (1971) el cortejo se puede dividir en niveles, siendo cada nivel definido por el mecanismo desencadenador del cortejo del macho. Así el nivel I requiere solo el contacto entre la pareja; el nivel II asumen la estimulación por medio de feromonas y el nivel III postula el reconocimiento visual de la hembra por el macho (Platnick 1971).

La información que puede ser transmitida durante el cortejo puede incluir la identificación de especies, estatus reproductivo y calidad (Huber 2005). La temprana y eficiente transferencia de información durante el cortejo es particularmente

importante en especies depredadores como las arañas (Schneider & Elgar 2001; Wignall & Herberstein 2013).

La selección sexual da forma a numerosas características en los animales, en su morfología, fisiología y comportamiento (Gregorič *et al.* 2016). Por lo que conocer el comportamiento de los individuos ayudaría a entender y descifrar los diferentes patrones de selección sexual que están operando en ellas.

Las arañas pertenecientes al Infraorden Mygalomorphae representan uno de los tres linajes principales dentro de las arañas (Bond *et al.* 2012) y constituyen el grupo hermano de las arañas más conocidas, las del Infraorden Araneomorphae. En términos de diversidad, las migalomorfas comprenden aproximadamente 2782 especies distribuidas en 344 géneros y 16 familias (World Spider Catalog 2018). Dicha diversidad conocida de especies representa sólo el 6% respecto de la diversidad de arañas del Infraorden Araneomorphae, por lo que las tasas de diversificación de estos dos grupos hermanos difieren claramente; las posibles causas de este fenómeno aún permanecen desconocidas (Coddington 2005). Estas arañas se distribuyen prácticamente en todo el mundo, pero las regiones tropicales y templadas australes de Sudamérica, junto con el sur de África y Australasia conforman centros de diversidad genética (Bond *et al.* 2012; Raven 1985).

Las arañas migalomorfas se reconocen fácilmente por: a) la posición paralela de sus quelíceros; b) hileras posteriores triarticuladas; c) presencia de cuatro pulmones; y d) ausencia de láminas maxilares (Coddington 2005; Raven 1985). Se encuentran entre las primeras arañas que han sido categorizadas como especies amenazadas, pero usualmente, debido a sus hábitos crípticos y comportamiento constructor de cuevas, el conocimiento sobre sus aspectos biológicos es limitado. Además, algunas

migalomorfas presentan características biológicas que difieren de las demás arañas: por ejemplo, algunas especies pueden vivir entre 15 y 30 años y tardar entre 5 y 7 años en alcanzar la madurez sexual (Main 1978); son especialistas y dependientes de un tipo determinado de hábitat y las hembras generalmente son sedentarias (Coyle & Icenogle 1994; Main 1978).

El periodo reproductivo de la mayoría de las arañas migalomorfas ocurre durante los meses cálidos del año. Los machos adultos son el sexo móvil y abandonan su vida sedentaria para dejar sus refugios y comenzar la búsqueda de hembras (Costa & Pérez-Miles 2002; Coyle & Icenogle 1994; Pérez-Miles *et al.* 2005). Luego de su maduración y antes de emprender dicha búsqueda, los machos realizan inducciones espermáticas. Durante este proceso, construyen una tela densa donde depositan la gota de esperma y luego por capilaridad la gota es absorbida por los órganos palpareos. A lo largo del periodo reproductivo, la carga de estos órganos puede ocurrir varias veces (Baerg 1928; Costa & Pérez-Miles 2002). Los machos deben asegurarse que las hembras los reconozcan como posible pareja y no como una presa potencial, por lo que realizan intrincados cortejos especie-específicos. Generalmente revelan su presencia a través de una serie de golpes rítmicos cerca de la entrada de la cueva o sobre el manto de tela (Ferretti *et al.* 2013a; Postiglioni & Costa 2006). Los canales de comunicación comúnmente utilizados en este grupo comprenden el químico y el sísmico (Copperi *et al.* 2012; Costa & Pérez-Miles 2002; Pérez-Miles *et al.* 2007; Quirici & Costa 2005).

La posición de cópula de estas arañas, en su mayoría, es frente a frente con el cuerpo inclinado mientras que los machos extienden sus pedipalpos por debajo del

cuerpo de las hembras. Los machos enganchan a la pareja con estructuras específicas llamadas apófisis tibiales o espolones. Con ellos enganchan los quelíceros u otras estructuras de las hembras, elevan su cuerpo e impiden posible ataques durante la cópula (Baerg 1928; Costa & Pérez-Miles 2002; Ferretti *et al.* 2013a).

La familia Nemesiidae cuenta con 46 géneros y 406 especies descritas, con una amplia distribución mundial, distribuidas a través de las regiones tropicales y subtropicales (World Spider Catalog 2018). El género *Acanthogonatus* Karsch 1880 contiene 29 especies y se encuentra distribuido en el sur de América del Sur especialmente Argentina y Chile (Goloboff 1995). *Acanthogonatus centralis* Goloboff 1995 es una araña de tamaño medio, viven bajo rocas en las áreas montañosas en la región central de Argentina (Fig. 1). Construyen pequeñas cuevas en la tierra continuadas por tubos de seda (Ferretti *et al.* 2011). El periodo reproductivo ocurre durante el otoño-invierno (Ferretti *et al.* 2012b). Durante el verano la actividad de esta araña disminuye, no encontrándose machos, mientras que hembras y juveniles cierran las entradas a las cuevas y no construyen tubos de seda (Ferretti *et al.* 2012b). Con respecto a su comportamiento reproductivo, tanto hembras como machos pueden reproducirse en más de una ocasión (Ferretti *et al.* 2011). El macho es el sexo móvil, las cópulas son cortas y luego de las mismas el macho huye mientras la hembra usualmente queda en estado cataléptico (Ferretti *et al.* 2011).



Figura 1. Hembra de *A. centralis* en su tubo de seda.

La familia Theraphosidae cuenta con 144 géneros y 967 especies descritas con amplia distribución mundial, las arañas pertenecientes a esta familia son conocidas como “tarántulas” o “arañas pollito” (World Spider Catalog 2018). *Grammostola vachoni* Schiapelli & Gerschman, 1961 sólo se encuentra en Argentina y habita principalmente en las zonas serranas y montañosas (Ferretti *et al.* 2012b). Las hembras pueden vivir hasta unos 30 años en cautiverio, mientras que los machos, una vez que alcanzan la madurez sexual viven solo unos pocos meses durante meses de Octubre a Diciembre (Ferretti *et al.* 2012b) (Fig. 2). Esta especie de tarántula ocupa cavidades o refugios debajo de las piedras y algunas incluso pueden construir pequeñas cuevas (Ferretti & Ferrero 2008). Debido a sus características biológicas y las amenazas del ambiente, *G. vachoni* fue incluida en la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN (“International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) bajo la categoría de “Vulnerable” (Ferretti & Pompozzi 2012).



Figura 2. Macho y hembra de G. vachoni

En las sierras o ambientes montañosos, esta especie comparte el hábitat con *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman, 1942) (Fig. 3). Debido a su amplia distribución, *P. longisternale* se encuentra en varias ecorregiones del país como Chaco Seco, Pampa, Monte y Espinal (Schiapelli & Gerschman 1942). Esta tarántula vive en cuevas poco profundas construidas bajo piedras (Costa & Pérez-Miles 1992). Las hembras y juveniles de avanzada edad cubren las paredes del refugio con abundante tela. Los machos salen en busca de hembras en los meses de marzo a junio, delimitando así un ciclo reproductivo otoñal-invernal (Ferretti *et al.* 2012b).



Figura 3. Macho y hembra de *P. longisternale*.

Existe una idea general que asume que las migalomorfas tienen repertorios de comportamiento simples (Baerg 1928; Platnick 1971). Razón por la cual constan muy poco estudios detallados de relaciones intraespecíficas en arañas migalomorfas (ver Jackson & Pollard, 1990; Costa & Pérez-Miles, 2002; Ferretti *et al.*, 2013a). Sin embargo, al tener características plesiomórficas, el estudio de este grupo constituye un punto inicial para formular hipótesis evolutivas de comportamiento que pueden ayudar en la comprensión de la evolución de patrones más complejos.

Pese a los comportamientos llamativos que presentaron las tarántulas, la utilización de *G. vachoni* y *P. longisternale* durante los próximos capítulos es limitada. *Grammostola vachoni* en el año 2012 fue catalogada como especie “vulnerable” por la IUCN (Ferretti & Pompozzi 2012) y actualmente se están llevando a cabo estudios como posible bio-indicador de los pastizales pampeanos (Schwerdt *et al.* 2018), por lo que se realizó la mínima colecta posible de individuos (se colectaron solo machos inmaduros y adultos) y no se sacrificó ningún ejemplar durante los ensayos. Con respecto a *Plesiofelma longisternale*, pese a los esfuerzos de muestreos, el número de

machos y hembras no fue el óptimo para realizar todos los ensayos (luego de las colectas se debió esperar una muda de las hembras para establecer su estatus reproductivo, en algunos casos se tardó más de un año hasta establecerlo). Por esta razón, durante los siguientes capítulos, *Acanthogonatus centralis* es el modelo de estudio preferencial.

## 2. Objetivos

2.1. Describir ciclos de vida y datos de la biología sexual de las tres especies de arañas migalomorfas modelos, a saber: *Grammostola vachoni*, *Plesiopelma longisternale* y *Acanthogonatus centralis*.

2.2. Analizar en detalle los etogramas de comportamiento sexual obtenidos y compararlos con lo registrado de forma general por otros estudios previos en estas especies.

2.3. Discutir los patrones de comportamiento sexual observados durante el cortejo y cópula desde perspectivas de selección sexual.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. *Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio*

Se realizaron 32 colectas manuales de animales durante los años 2013 y 2016 en Sierra de la Ventana (2013= 9; 2014=7; 2015=12; 2016=4). Una vez llevados al laboratorio los ejemplares de *A. centralis* se acondicionaron individualmente en cajas de Petri de plástico con sustrato de tierra y un algodón embebido en agua como bebedero. Cada ejemplar de *P. longisternale* se acondicionó en recipientes individuales de plástico (10 cm diámetro x 5 cm), con base de tierra y un pequeño recipiente como bebedero. *Grammostola vachoni* se mantuvo en recipientes de acuerdo a su tamaño con base de tierra y un pequeño recipiente como bebedero. La sala de cría del laboratorio de Zoología de Invertebrados II contaba con un total 30 hembras adultas de *G. vachoni* al inicio de esta tesis, por lo que se decidió solo realizar capturas de machos inmaduros y machos adultos.

Los individuos se alimentaron una vez a la semana y según su tamaño la alimentación fue a base de larvas, ninfas o adultos de *Gryllus assimilis* (Orthoptera, Gryllidae), *Blatella germanica* (Blattodea, Blatellidae), *Blaptica dubia* (Blattodea, Blaberidae), *Shelfordella tartara* (Blattodea, Blattidae) o *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). El fotoperiodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

#### 3.2. *Ciclo de vida, desarrollo y maduración*

##### 3.2.1. *Historia Natural*

Durante cinco años se tomaron datos de colecta y cría de las tres especies de migalomorfos utilizadas en este estudio bajo condiciones de laboratorio.

Se registraron las mudas y la aparición de características para la determinación del sexo de los individuos. Para ello, las mudas fueron observadas bajo lupa estereoscópica, con el fin de hallar espermatecas, en el caso de las hembras, o la ausencia de ellas, en el caso de juveniles o machos inmaduros.

### 3.2.2. *Maduración*

Con el fin de dilucidar si la aparición de espermatecas coincidía con la maduración sexual se implementó un sistema de cría de 15 camadas de individuos de *A. centralis*. Se utilizaron 11 para el análisis del porcentaje de supervivencia desde la eclosión hasta la maduración y 4 para el análisis histológico. Para este último se sacrificó y se diseccionó a 10 individuos de cada uno de los primeros 5 estadios de desarrollo fuera de la ooteca. Los abdómenes se fijaron en Duboscq-Brazil y se procesaron según técnicas histológicas de rutina. Se realizaron cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  de espesor y se colorearon con Tricrómico de Masson y Hematoxilina-Eosina (H-E).

### 3.3. *Descripción de cortejo y cópula*

Se procedió a la descripción del repertorio de cortejo de los machos y hembras. Las unidades comportamentales se compararon con las descritas en la bibliografía para las tres especies. Para la descripción de cortejo y cópulas se utilizaron registros de cruces realizadas en los ensayos de los capítulos 2, 3, 4 y 5. Se tomaron al azar 10 interacciones exitosas, de las que se analizaron el tiempo de cortejo, unidades comportamentales, tiempo de cópula, número de inserciones, catalepsis y agresiones.

## 4. Resultados

### 4.1. *Historia Natural*

#### *Plesiopelma longisternale*

Durante este periodo de investigación se mantuvieron en el laboratorio 25 hembras y 14 machos de *P. longisternale*. Se colectaron cuatro machos adultos a campo en los meses de marzo, abril y julio. El resto de los machos se obtuvo a partir de juveniles en el laboratorio (Fig. 4). Se observaron espermatecas en mudas de 18 juveniles, las que pasaron a estatus de hembra virgen y se colectaron cinco ejemplares a los que se les determinó el sexo luego de la construcción de ootecas en el laboratorio.

Las cuevas de los individuos se caracterizaron por presentar todas las paredes densamente tapizadas con tela, salvo en los juveniles muy pequeños.

Se observó la construcción de una ooteca única por hembra por periodo reproductivo en los meses de julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre, registrándose su eclosión a los  $75,2 \pm 4,5$  días (N=5). Las hembras mantuvieron la ooteca "móvil" entre sus patas delanteras y palpos hasta la eclosión. Las ootecas presentaron un tamaño medio de  $18,06 \pm 3$  mm y un peso de  $0,62 \pm 0,62$  gramos. El éxito de eclosión bajo condiciones de cautiverio fue de 52% (N=19). El promedio de juveniles por ooteca fue muy variado  $70 \pm 54,6$  (N=8) (rango 6-164). Luego de tres años se comenzó a observar la presencia de espermatecas y la aparición de machos adultos.

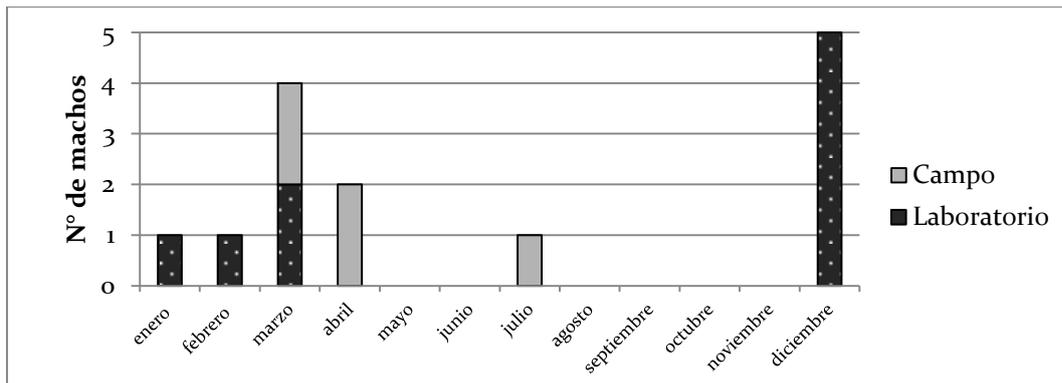


Figura 4. Meses donde se colectaron machos de *P. longisternale* en el campo y juveniles mudaron a adulto.

### *Grammostola vachoni*

La cátedra de Zoología de Invertebrados II cuenta con una cría de *G. vachoni* desde el año 2006, de la cual se realiza un seguimiento de los ejemplares desde el año 2007. En la actualidad se mantienen 34 hembras adultas y ocho machos inmaduros.

Durante el periodo de estudio se obtuvieron de la cría de individuos inmaduros en el laboratorio, ocho hembras (Fig. 5) y nueve machos. Se colectaron de Sierra de la Ventana ocho machos adultos y 12 machos inmaduros (Fig. 6). Bajo condiciones de laboratorio, las hembras adultas cambian su exoesqueleto una vez 748,25 días (N=23), principalmente en los meses de verano (Fig. 7); los juveniles o inmaduros suelen mudar todos los años. En el criadero existen hembras con más de 12 años de cautiverio.

Los ejemplares fueron hallados bajo piedra en cerros de variada altura. Las cuevas o refugios consistían en pequeñas cavidades, con escasa o nula seda. En los bordes de las cuevas se observaron restos de comida, exoesqueletos e incluso restos de ootecas.

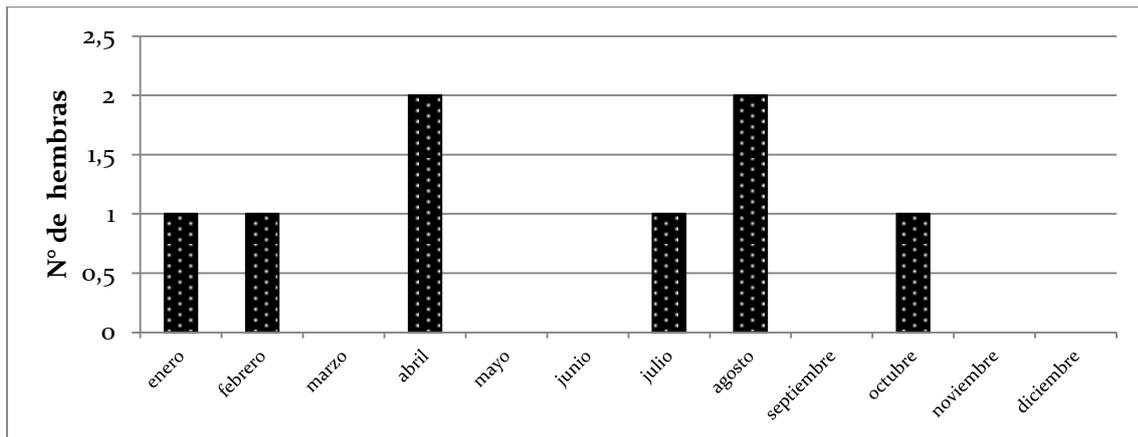


Figura 5. Meses donde las hembras de *G. vachoni* cambiaron su exoesqueleto y se observó la presencia de espermatecas.

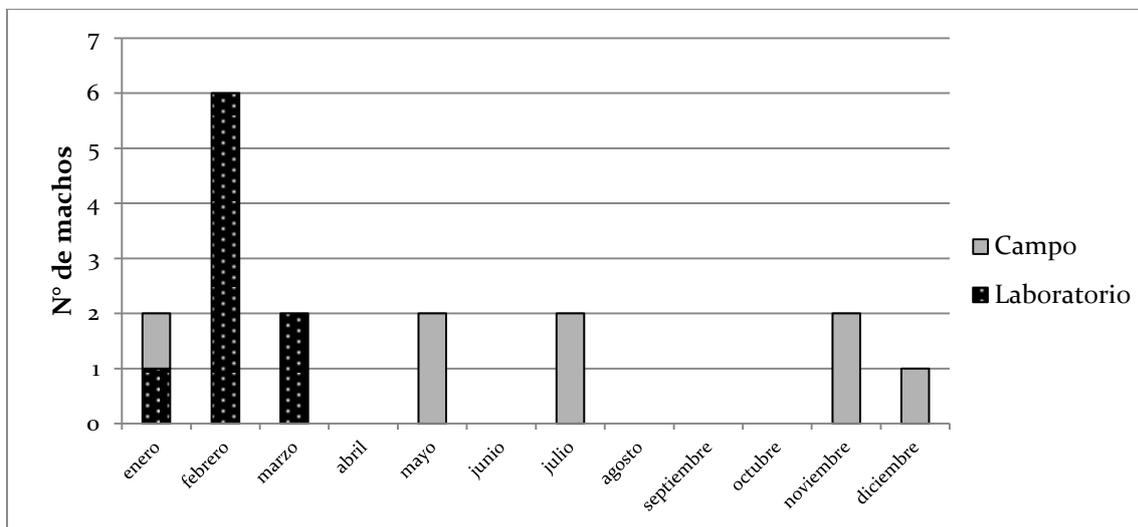


Figura 6. Meses donde se colectaron machos de *G. vachoni* en el campo y juveniles mudaron a adulto.

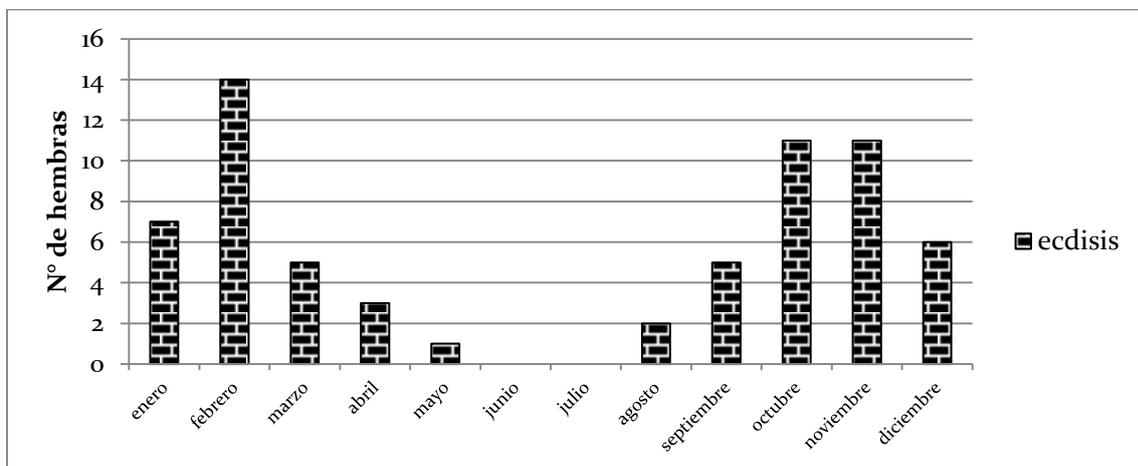


Figura 7. Meses donde las hembras adultas de *G. vachoni* mudan su exoesqueleto.

*Acanthogonatus centralis*

Durante este periodo de investigación se obtuvieron en el laboratorio 139 hembras adultas y 165 machos de *A. centralis*. Por medio de colectas en Sierra de la Ventana se capturaron 112 machos adultos, los cuales mostraron un pico invernal (Fig. 8). También se colectaron 198 individuos que se nombraron “juveniles”. Del total de estos ejemplares, luego de mudar en el laboratorio se logró realizar la identificación sexual de 50 machos y 59 hembras, además de que 57 de ellos construyeron ooteca lo que facilitó su identificación como hembra y madura.

Los machos se hallaron en su totalidad bajo piedra, pudiéndose observar en ciertas ocasiones un pequeño refugio de tela. Los “juveniles” presentaban una pequeña cueva seguida de un tubo de seda densa. En los meses de verano disminuyó la abundancia de los ejemplares (Fig. 9).

Se observó la construcción de una ooteca única móvil por hembra por periodo reproductivo en los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre registrándose su eclosión a los  $30,4 \pm 7,3$  días (N=17). Las ootecas presentaron un tamaño medio de  $8,7 \pm 1,4$  mm (N=7). El éxito de eclosión bajo condiciones de cautiverio fue del 46,6 % (N= 45). El promedio de huevo por ooteca fue de  $15,9 \pm 5,4$  (N=7) (rango 11-24), una vez eclosionados la cantidad de juveniles por ooteca fue  $17,6 \pm 10,4$  (N=20) (rango 4-39). Los individuos mudaron un vez dentro de la ooteca, fuera de ella permanecieron con su madre dentro de la cueva hasta la segunda muda, luego se dispersaron caminando.

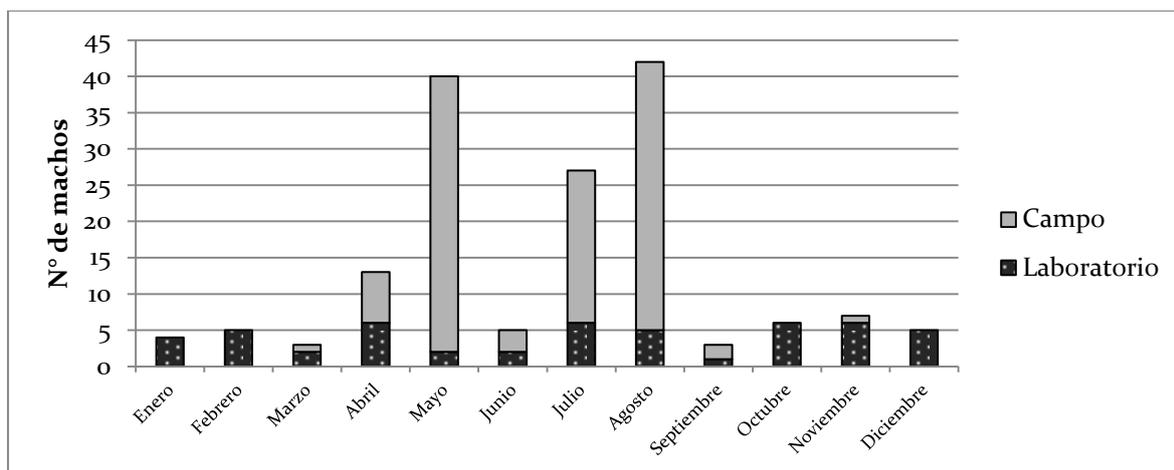


Figura 8. Meses donde se colectaron machos de *A. centralis* en el campo y juveniles mudaron a adulto.

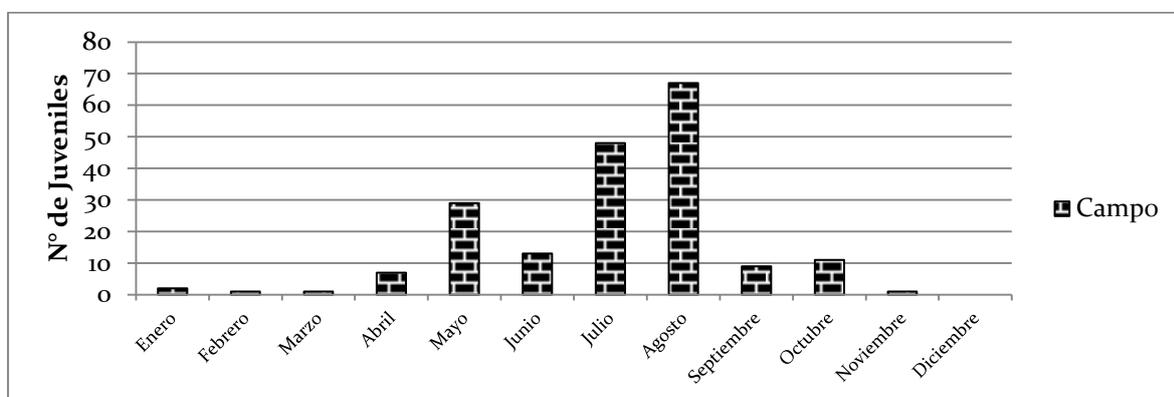


Figura 9. Meses donde se colectaron "Juveniles" de *A. centralis* en el campo.

#### 4.2. Maduración

De 181 ejemplares el 29.28% alcanzó la adultez (47.1% ♀, 52.9% ♂). La presencia de espermatecas bien formadas que indica el desarrollo sexual de las hembras, se estableció a partir del cuarto estadio (Fig. 10) y la mayor cantidad de mudas con espermatecas se produjo a principios del invierno, coincidiendo con el periodo reproductivo (Fig. 11).

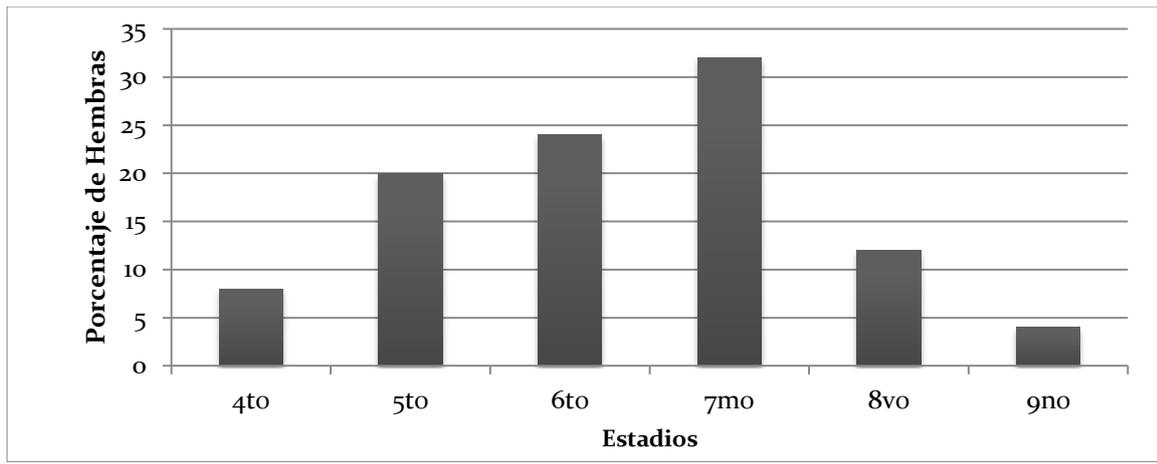


Figura 10. Porcentaje de hembras de *A. centralis* en cada estadio en el que se observaron espermatecas.

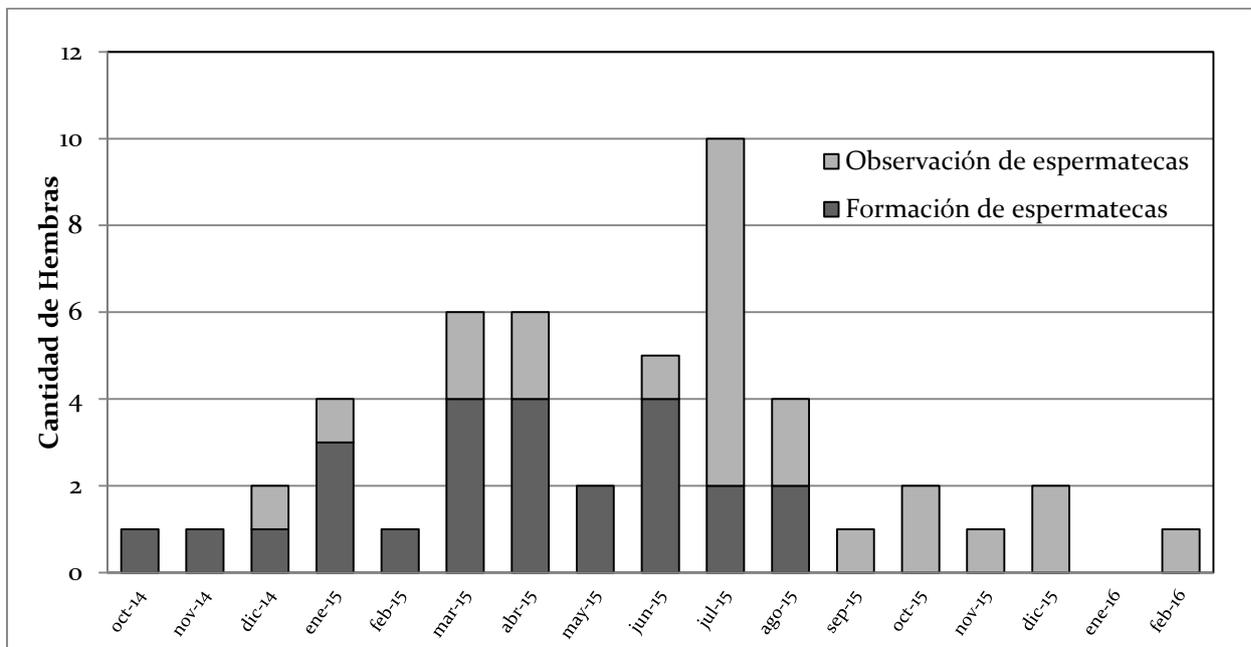


Figura 11. Mudas y desarrollo sexual en hembras de *A. centralis*.

La formación de espermatecas se dio a los  $519,3 \pm 76,09$  días (415-624) pero su observación recién se produjo a los  $638,2 \pm 109,4$  días desde la eclosión. A través de los estudios histológicos, se observó que a partir del tercer estadio, se encuentran ovocitos pedicelados, de distinto tamaño, unidos a un epitelio simple plano que, presuntamente, sería parte de la pared ovárica (figura 12 y 13). Cada folículo y su

pedicelo se encuentran recubiertos por una membrana acelular. Bajo condiciones de laboratorio se ha observado que las hembras pueden vivir más de tres años.

Los machos se comenzaron a observar a partir de la quinta muda, el promedio de días hasta la maduración fue de  $635,9 \pm 72,1$  (1,74 años) con un rango de 528 a 830 días.



Figura 12. Ovocitos previtelogénicos a partir del 3º estadio de desarrollo: A) Vista general de un corte longitudinal del opistosoma de una hembra de *A. centralis* de estadio 5. Flechas: ovocitos, \*: glándulas de la seda. Escala:  $250\mu\text{m}$ . Coloración: H-E. B) Detalle de la membrana basal que rodea al ovocito (flecha) y pared del ovario; cg: células germinales; n: núcleo; \*: lumen del ovario. Escala:  $20\mu\text{m}$ . Coloración: Tricrómico de Masson.

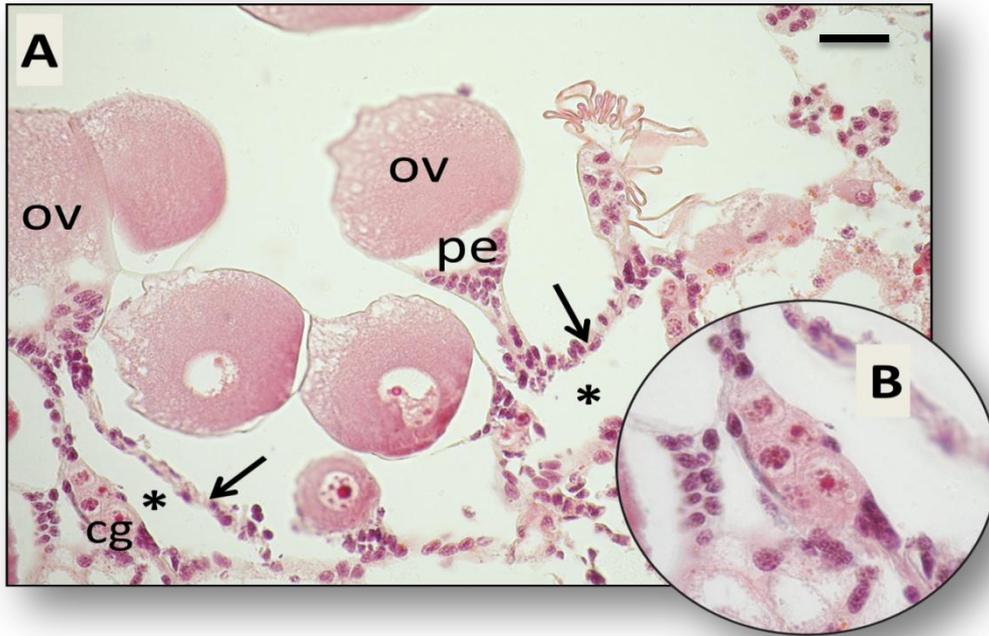


Figura 13. A) Ovocitos previtelogénicos en diferentes estadios de desarrollo. B) Detalle de las células germinales. \*: Lumen del ovario; flechas: pared ovárica; cg: células germinales; ov: ovocitos; pe: pedicelo. Escala: 37,5  $\mu$ m. Coloración: Tricrómico de Masson.

#### 4.3. Cortejo y Cópula

##### *Plesiopelma longisternale*

Las hembras fueron colocadas días previos en los terrarios con el fin de una mejor adaptación al ambiente y una amplia señalización del sector con rastros de su tela. Los machos al ser ubicados cuidadosamente en el extremo opuesto de la entrada de la cueva de la hembra, comenzaron su caminata sigilosa por la arena. Al detectar los rastros de la hembra los machos comienzan su cortejo. El tiempo entre el ingreso al terrario y el inicio del cortejo, conocida como la latencia de cortejo, tuvo una duración promedio de  $91,7 \pm 69$  segundos (rango 15-180). Unidades del cortejo de *P. longisternale* se describen en la tabla 1. Durante su desplazamiento sobre el sustrato, los machos elevan el primer par de patas bajándolo cuidadosamente, movimiento que

se repite durante las vibraciones corporales. Una vez que encuentra la entrada a la cueva, la intensidad del cortejo aumenta y se concentra en esa región (Fig. 14). La hembra se aproxima a la entrada de su cueva donde el macho la engancha y enseguida comienzan las inserciones. Durante las últimas inserciones el macho comienza a realizar nuevamente vibraciones corporales, unidad comportamental que puede repetir una vez que se aleja de la hembra. Duraciones y cantidades promedios de las unidades comportamentales y de la cópula se plasman en la tabla 2. No se observaron canibalismos por parte de las hembras, aunque en algunas ocasiones, al finalizar la cópula, la hembra avanzó sobre el macho con la siguiente huida del mismo.

Tabla 1. *Comportamientos de machos y hembras de P. longisternale durante los encuentros sexuales. Referencia (Costa & Pérez-Miles 1992)*

COMPORTAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA	PRESENTE TRABAJO
<b>Cortejo del macho</b>			
<i>Palpar</i> (“palpal drumming”)	Movimientos ascendentes y descendentes alternados del palpo contra el sustrato	X	
<i>Vibraciones corporales</i>	Movimientos de alta frecuencia del cuerpo y/o patas causadas por contracciones de pata III	X	X
<i>Golpes espasmódicos</i> (“leg tapping”)	Golpes con patas delanteras contra el cuerpo de la ♀	X	X
<b>Comportamientos en la cópula</b>			
<i>Enganche</i>	Apófisis del ♂ enganchan los quelíceros de la ♀ y la elevan	X	X
<b>Comportamiento de la hembra</b>			
<i>Catalepsis</i>	Estado de quietud luego de la cópula		X

Tabla 2. *Parámetros del cortejo y cópula de P. longisternale. Los datos se presentan como media ± desvío estándar. Las duraciones se presentan en segundos.*

		MEDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
<b>Duración cortejo</b>		440,8 ± 520	1310	15
<b>Vibraciones</b>	Antes	88,7 ± 73,8	215	8
	Durante Cópula	11,6 ± 6,6	16	0
	Posterior	5,6 ± 11,4	26	0
<b>Golpes espasmódicos</b>		7,8 ± 3,7	13	3
<b>Duración cópula</b>		433,3 ± 163,5	663	240
<b>Número de inserciones</b>		8,3 ± 2,5	11	6
<b>Duración promedio inserciones</b>		56,2 ± 3,4	58,3	52,25



Figura 14. Macho de *P. longisternale* (izquierda) durante el “enganche” y comienzo de las inserciones pedipalmares. Hembra (derecha) en la entrada de su cueva densamente tapizada con seda.

Grammostola vachoni

Al igual que con *P. longisternale*, las hembras fueron colocadas días previos en los terrarios y los machos se ubicaron cuidadosamente en el extremo opuesto de la entrada de la cueva de la hembra. Al detectar los rastros de la hembra los machos comienzan su cortejo. La latencia de cortejo, tuvo una duración promedio de  $246,1 \pm 359,5$  segundos (rango 16-1077). Unidades del cortejo de *G. vachoni* se describen en la tabla 3. La hembra si se encuentra receptiva se mueve hacia la entrada de la cueva, donde el macho luego de unos golpes sobre el cefalotórax de la hembra, la engancha y comienzan las inserciones. Previo a las inserciones se observaron contracciones corporales de las hembras, acompañadas con vibraciones del macho. Duraciones y cantidades promedios de las unidades comportamentales y de la cópula se plasman en la tabla 4. No se observó canibalismo por parte de las hembras, aunque en algunas ocasiones, al finalizar la cópula, la hembra avanzó sobre el macho con la siguiente huida del mismo.

Tabla 4. *Parámetros del cortejo y cópula de G. vachoni. Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar. Las duraciones se presentan en segundos.*

	MEDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
Duración cortejo	$208,0 \pm 198,6$	570	40
Palpar	$4,3 \pm 2,9$	10	1
Tamborileo	$8,4 \pm 9,3$	26	0
Vibración	$5,4 \pm 6,7$	19	0
Golpe seco	$3,3 \pm 6,4$	17	0
Golpe espasmódico	$24,1 \pm 22,4$	65	0
Catalepsis	$92,3 \pm 113,6$	338	0
Contracción corporal	$19,0 \pm 10,9$	34	8
Duración de la cópula	$87,4 \pm 70,8$	237	3
Número de Inserciones	$4,8 \pm 3,5$	11	1
Duración promedio inserciones	$9,0 \pm 5,6$	14	0

Tabla 3. *Comportamientos de machos y hembras de G. vachoni durante los encuentros sexuales.*

Referencias: Ferretti & Ferrero, 2008; Copperi *et al.*, 2012.

COMPORTAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS	PRESENTE TRABAJO
<b>Cortejo del macho</b>			
<b>Palpar</b> ( <i>“palpal drumming”</i> )	Movimientos ascendentes y descendentes alternados del palpo contra el sustrato a velocidad constante	X	X
<b>Tamborileo</b>	Movimientos ascendentes y descendentes alternados del palpo contra el sustrato con aumento de velocidad y frecuencia	X	X
<b>Vibraciones corporales</b>	Movimientos de alta frecuencia del cuerpo o patas causadas por contracciones de pata III	X	X
<b>Golpes seco</b> ( <i>“leg tapping”</i> )	Golpes con patas delanteras extendidas contra el sustrato, cada par independiente o simultáneamente	X	X
<b>Golpes espasmódicos</b>	Golpe vigoroso de pata II contra el cuerpo de la hembra durante el enganche y desenganche	X	X
<b>Comportamientos del macho en la cópula</b>			
<b>Enganche</b>	Apófisis del macho enganchan los quelíceros y elevan el cuerpo de la hembra	X	X
<b>Cortejo de la hembra</b>			
<b>Golpeteo</b> ( <i>“leg tapping”</i> )	Patas y palpos flexionados, elevándolos y bajándolos contra el sustrato	X	
<b>Contracciones corporales</b>	Movimientos rápidos de alta frecuencia de todo el cuerpo producidos por movimientos de las patas III	X	X
<b>Comportamientos de la hembra en la cópula</b>			
<b>“Gaping display”</b>	Elevación de cefalotórax con elevación de los dos primeros pares de patas y apertura de quelíceros	X	X
<b>Catalepsis</b>	Estado de quietud luego de la cópula		X

### *Acanthogonatus centralis*

Las hembras se utilizaron en sus propios terrarios, los cuales contenían un tubo de seda como refugio. Los machos al ser depositados cuidadosamente en el extremo opuesto de la entrada del tubo de seda de la hembra, comenzaron su caminata sigilosa por la arena. Al detectar los rastros de la hembra los machos comienzan el cortejo. La latencia de cortejo, tuvo una duración promedio de  $115,2 \pm 118,7$  segundos (rango 0-375). Unidades del cortejo de *A. centralis* se describen en la tabla 5. Las hembras se aproximan al macho cortejante o luego del acercamiento del macho y posterior contacto con la hembra, ella sale de su tubo. El cortejo del macho se divide en dos partes, la primera presenta movimientos corporales y golpes de patas sobre el sustrato/tela; y la segunda es el cortejo que el macho realiza sobre la hembra una vez que entraron en contacto mientras intenta el correcto enganche. Las duración del cortejo que los machos realizaron fueron: antes del contacto  $242,2 \pm 224,8$  segundos (0-612); en contacto  $86,8 \pm 38,5$  segundos (32,8 - 141,6). Duraciones y cantidades promedios de las unidades comportamentales y de la cópula se plasman en la tabla 6. No se observaron canibalismos por parte de las hembras, aunque en algunas ocasiones, al finalizar la cópula, la hembra avanzó sobre el macho con la siguiente huida del mismo.

Tabla 5. *Comportamientos de machos y hembras de G. vachoni durante los encuentros sexuales.*  
Referencias: Ferretti et al., 2011.

COMPORTAMIENTO	DESCRIPCIÓN	PRESENTE	
		REFERENCIAS	TRABAJO
<b>Cortejo del macho</b>			
<b>Rasgar</b> ( <i>“scratching”</i> )	Patas I y II sobre el sustrato extendidos con movimientos hacia adelante y atrás	X	X
<b>Tirones</b> ( <i>“stretching”</i> )	Pata I extendida toca la tela, flexiona fémur y patella en 45°. Brusco y sincrónico	X	X
<b>Repiqueteo</b>	Patas I y II flexionadas golpeando el sustrato. Asincrónico		X
<b>Espasmo</b>	Patas I extendidas sin tocar el sustrato, descienden con movimiento oscilante. Sincrónico		X
<b>Contracción</b>	movimiento brusco que empuja el cuerpo hacia las patas de patas I y II flexionadas sobre el sustrato		X
<b>Masaje</b>	Toques con pata II sobre la región dorsal y lateral del cefalotórax de la ♀. Asincrónicos	X	X
<b>Sacudida</b>	Movimiento brusco luego del enganche que posiciona a la hembra en la posición de cópula		X
<b>Golpes a la hembra</b>	Golpes con los pedipalpos en el esternón de la ♀ en posición de cópula. Asincrónicos	X	X
<b>Golpe espasmódico</b>	Golpe vigoroso con pata II y III contra patas y cuerpo de la hembra	X	
<b>Golpes (“beats”)</b>	Golpe de las patas I y II contra el sustrato.	X	
<b>Comportamientos de la hembra en la cópula</b>			
<b>“Body jerks”</b>	Movimiento brusco del cuerpo por contracción de patas y palpos antes de las inserciones	X	
<b>Catalepsis</b>	Estado de quietud luego de la cópula		X

Tabla 6. *Parámetros del cortejo y cópula de A. centralis. Los datos se presentan como media ± desvío estándar. Las duraciones se presentan en segundos.*

		<b>MEDIA</b>	<b>MÁXIMO</b>	<b>MÍNIMO</b>
<i>Rasgar</i>		5,1 ± 5,8	17	0
<i>Tirones</i>	<b>Cortejo previo contacto</b>	1,3 ± 3,8	14	0
<i>Repiqueteo</i>		13,1 ± 16,8	51	0
<i>Contracción</i>		38 ± 68	217	0
<i>Espasmos</i>		1,4 ± 4,4	14	0
<i>Masajes</i>	<b>Cortejo en contacto</b>	96,4 ± 39,6	164	26
<i>Sacudidas</i>		5,8 ± 4,0	15	2
<i>Golpes a la ♀</i>		380,6 ± 220,3	794	88
<i>Catalepsis</i>		27,1 ± 29,8	85,76	0
<i>Duración de cópula</i>		84,9 ± 86,9	294,5	9,8
<i>Número de inserciones</i>		8,7 ± 5,3	15	2
<i>Duración Promedio de inserciones</i>		3,7 ± 1,3	6,08	1,856

## 5. Discusión

### 5.1. *Historia Natural*

Los registros de colecta de *P. longisternale* muestran un periodo reproductivo otoño-invernal que coincide con lo observado para Sierra de la Ventana (Ferretti *et al.* 2012b) pero no coincide completamente con Uruguay, en donde los machos caminantes también se observaron de agosto a diciembre (además de los meses abril y mayo) (Costa & Pérez-Miles 2002). Los machos de *G. vachoni* se observaron en varios momentos del año; de noviembre a diciembre coincidiendo con los picos estivales de los machos del género (Costa & Pérez-Miles 2002) y en meses invernales. En el laboratorio se observó que los machos inmaduros mudan durante el verano, lo que sugiere que los juveniles aprovechan la abundancia de comida de estos meses, maduran y luego hibernarían hasta mediados de la primavera para salir a buscar pareja, lo que coincide con la observación de machos con sus mudas en cuevas durante el invierno (observación personal). Las hembras de *G. vachoni* cambian de exoesqueleto en los meses cálidos, presentando un gran pico en febrero, similar a otras hembras de la familia (Costa & Pérez-Miles 2002; Minch 1977; Pérez-Miles *et al.* 2005). La gran actividad de machos de *A. centralis* se observó desde el inicio del otoño hasta finales del invierno. El periodo reproductivo invernal está ampliamente distribuido en la familia (Decae 2005) y en el género (Capocasale & Perez-Miles 1990). Bajo condiciones de laboratorio se observó a machos de *A. centralis* llegar a la adultez durante todo el año, la temperatura y el alimento fueron constantes en el invierno y verano, quizás que para esta especie, esos factores contribuyeron a la continua aparición de individuos adultos. Durante el verano juveniles y hembras adultas se refugian y su actividad disminuye al mínimo (Ferretti *et al.* 2012b), en esta etapa el

tubo exterior de seda desaparece y los individuos viven en el interior de la cueva, la cual presenta la porción superior obliterada con sustrato.

La construcción de ootecas en *P. longisternale* se observó a partir de dos meses de la última observación de machos a campo. Tanto los días de incubación como así los meses de puesta de los huevos difirieron con las poblaciones de *P. longisternale* de Uruguay (Costa & Pérez-Miles 2002). La conservación del esperma en las espermatecas de las hembras por tanto tiempo da lugar a una posible competencia de las eyaculadas o posibles manipulaciones por parte de la hembra (Birkhead & Møller 1998; Eberhard 1996). En *A. centralis* el tiempo entre machos y ootecas fue menor, llegándose a solapar la presencia de machos y la puesta de huevos. La cantidad de huevos y juveniles observadas fue menor que para otras especies de la familia como *Prorachias bristowei* (Souza-Silva *et al.* 2014) y *Acanthogonatus franckii* (Calderón *et al.* 1990), aunque las hembras de esta última especie llega a un tamaño mayor que las hembras de *A. centralis*.

## 5.2. Maduración

Los resultados obtenidos del análisis histológico del ovario concuerdan con lo descrito en otras especies de arañas (Margraf *et al.* 2011; Michalik *et al.* 2005; Morishita & Ferreira 2003). Se pudo establecer que el desarrollo de los ovarios antecede al de las espermatecas. Sin embargo, dada la ausencia de ovocitos vitelogénicos en los estadios analizados, no fue posible determinar con esta técnica el momento exacto del inicio de la madurez sexual. La formación de las espermatecas es anterior al surgimiento de los machos y del periodo reproductivo, dando un tiempo de acondicionamiento antes del primer apareamiento. Por otro lado, algunas hembras

presentan espermatecas bien formadas un periodo reproductivo antes que sus hermanos maduren, previniéndose así la cópula entre ellos. También se observó que hembras vírgenes mudaron a mitad del invierno; esta renovación de espermatecas durante el periodo reproductivo puede tomarse como una estrategia que optan las hembras cuando el periodo está terminando y todavía no copularon. Quizás una nueva espermateca y cuerpo más grande le brinde una mayor oportunidad de éxito reproductivo (Prenter *et al.* 1999). Una vez que las hembras copulan, no se produce una nueva muda hasta la eclosión de los juveniles. Con el nuevo exoesqueleto surge una nueva espermateca limpia sin restos de esperma a diferencia de las hembras de las Araneomorphae que salvo rara excepciones viven solo un periodo reproductivo (Foelix 2011).

### 5.3. Cortejo y Cópula

Costa & Pérez-Miles (1992) describen el cortejo y cópula de *P. longisternale* de las poblaciones de Uruguay y aunque las duraciones, inserciones y posición de cópula fueron similares a la población de Sierra de la Ventana, se encontraron diferencias en el cortejo. Las poblaciones de Sierra de la Ventana no utilizaron el comportamiento “palpar”. Este comportamiento se encuentra ampliamente distribuido entre las tarántulas y se considera una unidad de comunicación de corta distancia (Costa & Pérez-Miles 2002; Quirici & Costa 2005). Teniendo en cuenta que la descripción de la especie *P. longisternale* fue realizada en el año 1942 con un holotipo de Santiago del Estero, en donde se detalla una amplia distribución por toda la Argentina (Schiapelli & Gerschman 1942); advirtiendo la existencia de importantes diferencias en cuanto a la fenología y el comportamiento de ambas poblaciones, se sugiere a partir de este

trabajo, una revisión a nivel específico con métodos más modernos de las poblaciones de Argentina y de Uruguay.

La tarántula *G. vachoni* no mostró diferencias en su cortejo con los anteriormente descritos (Ferretti & Ferrero 2008). La ausencia de “golpeteos” por parte de la hembra no se considera una carencia de este comportamiento, dado que no es un comportamiento observado frecuentemente (observación personal). Los golpeteos se consideran un cortejo positivo de la hembra que ayudarían a la orientación del macho (Copperi *et al.* 2012). Durante los ensayos realizados, los cortejos no fueron de larga duración debido a una rápida unión de las parejas, lo que llevó a la ausencia de señales de ubicación de la hembra. El cortejo ayuda al reconocimiento de la pareja y orienta a la hembra hacia el macho (Shillington & Verrell 1997).

Ambas tarántulas, *G. vachoni* y *P. longisternale*, presentaron la secuencia de cortejo, enganche y cópula dentro de los parámetros de la familia y respectivos sus géneros (Costa & Pérez-Miles 1992, 2002; Ferretti *et al.* 2013a; Ferretti & Ferrero 2008; Shillington & Verrell 1997; Yáñez *et al.* 1999).

Por medio de este estudio se describe con más detalle el cortejo y cópula de *A. centralis*. A los comportamientos ya descritos se agregaron unidades y se hace diferencia entre el cortejo del macho antes del contacto y después de éste (Ferretti *et al.* 2011). Aunque su duración es menor, el cortejo en contacto es más intenso que el cortejo previo. El comportamiento “golpe espasmódico” se lo incluyó dentro de los movimientos que el macho hace con pata II antes y durante el enganche. La unidad “body jerks” de las hembras, en este trabajo se la consideró equivalente a “sacudidas” del macho (comunicación personal con Ferretti). Tanto las inserciones como la

posición de cópula fueron similares a lo establecido para esta especie y otras dentro de su género (Ferretti *et al.* 2011; Pérez-Miles & Capocasale 1982).

#### 5.4. Cortejo, estructuras y su funcionalidad

Durante el enganche, los quelíceros de las hembras quedan inmovilizados y trabados con los espolones de los machos. Pese a una inicial creencia de que este comportamiento actuaba como una precaución de los machos contra una tendencia caníbal y agresiva de las hembras (Jackson & Pollard 1990); actualmente debido a casi ausencia de ataques y solo escasos registros de agresiones post-cópula (Costa-Schmidt *et al.* 2017; Costa & Pérez-Miles 2002; Ferretti *et al.* 2013a), el enganche sería un comportamiento en donde las dos partes interactúan y coordinan la posición de cópula. La posición de cópula enfrentados sería una regla dentro de las migalomorfas, salvo la tarántula *Sickius longibulbi* que carece de espermatecas, donde los machos adoptan una posición diferente al resto del grupo; en estas arañas luego del enganche el macho empuja a la hembra hasta que queda acostada contra el sustrato, para luego el macho posicionarse en un ángulo de 90° encima de ella, de esta forma se supone que sus inserciones alcanzarían a depositar esperma en el oviducto (Bertani *et al.* 2002, 2008).

No obstante, dos comportamientos son de atención en estas tarántulas, la vibración de los machos de *P. longisternale* durante los últimos momentos de la cópula y las contracciones de las hembras de *G. vachoni* antes y durante la cópula. La estimulación de las hembras a través de movimientos durante la cópula se conoce como cortejo copulatorio y se correlaciona positivamente con la elección de pareja (Eberhard 1985, 1991, 1996). Los machos de *P. longisternale* podrían estar estimulando

a la hembra para poder realizar mayor cantidad de inserciones y de esta forma transferir mayor cantidad de esperma o podrían estar estimulando a las hembras para que internamente almacenen o en un futuro utilicen su esperma para fertilizar mayor número de huevos. En cuanto a las hembras de *G. vachoni*, el comportamiento de contracción se relaciona con un rechazo de la hembra hacia el macho (Copperi *et al.* 2012). Este comportamiento es realizado usualmente ante el cortejo del macho, en donde la hembra responde con movimientos que generan una corriente de aire o vibraciones sísmicas desde la cueva y el macho en respuesta huye (Copperi *et al.* 2012; Costa *et al.* 2013b; Pérez-Miles *et al.* 2005). En este caso las hembras realizaron las contracciones ante el contacto y/o enganche pero el macho en vez de huir contestó con vibraciones. Luego el macho realizó las inserciones y posterior a la separación de la pareja no se observaron agresiones (algunas hembras quedaron en estado de catalepsis). Esta comunicación entre la pareja durante la cópula cambiaría la señal de rechazo de la hembra a una aceptación de la cópula (Peretti & Aisenberg 2011). Sin embargo ante la insistencia del macho, la hembra podría estar aceptando la cópula para luego desechar el esperma, aunque corre mayores riesgos y enfrentaría un gasto energético.

En *A. centralis* el cortejo previo actuaría de identificador y orientador de posible pareja a través de comunicación sísmica (Quirici & Costa 2005). En cambio el cortejo en contacto estaría brindando a la hembra información más objetiva de las cualidades e identidad del macho, que podrían influenciar sus decisiones futuras (Eberhard 1996). En algunas especies de tarántulas, las hembras pueden responder ante el cortejo de un macho de otra especie, pero luego del contacto solo enganchan con co-específicos (Costa *et al.* 2013b). Ambos individuos presentan lípidos cuticulares que brindan

información al actuar como señales químicas (feromonas) (Gaskett 2007; Tralalon 2011). Por lo tanto durante este cortejo, además de los movimientos realizados por el macho, existe una comunicación a nivel químico.

## Comunicación Intersexual a Nivel Químico

## 1. Introducción

Se considera comunicación animal a cualquier comportamiento emitido por un individuo, que al enviar una señal produce un efecto sobre el comportamiento presente o futuro de otro animal (Nentwig 2013). La comunicación química, ya sea a través de productos volátiles o de feromonas de contacto, es el modo de comunicación más primitivo entre animales (Nentwig 2013; Pollard *et al.* 1987). En muchas especies, el rol más importante que posee la misma es durante el cortejo, momento en que el macho y la hembra están próximos entre ellos (Wyatt 2003).

Las feromonas (volátiles o de contacto) son señales químicas que provocan, generalmente, respuestas mutuamente beneficiosas entre receptores intraespecíficos (Karlson & Luscher 1959; Wyatt 2003). Las feromonas sexuales atraen al sexo opuesto de una misma especie durante la temporada reproductiva, éstas disparan comportamientos de búsqueda y de cortejo, además de poder sincronizar la actividad reproductiva de parejas potenciales en espacio y tiempo (Gaskett 2007; Johansson & Jones 2007; Karlson & Luscher 1959).

En la mayoría de las especies son las hembras quienes eligen la pareja con quien aparearse, esto se debe a que el sexo femenino invierte más energía en la descendencia (Andersson 1994; Trivers 1972; Williams 1975). Sin embargo, en algunos casos la selección la realizan los machos exhibiendo de este modo elección de pareja, eligiendo a las hembras en mejores condiciones corporales, las cuales se presume que serían las más fecundas (Bonduriansky 2001; Edward & Chapman 2011). Bonduriansky (2001) describe como elección de pareja masculina pre-cópula a: la aceptación o rechazo de una hembra en particular, a la variación en la intensidad o frecuencia del cortejo y a los intentos de cópula hacia hembras con diferencias en sus cualidades como pareja.

Cuando los machos invierten considerablemente en el apareamiento con cortejos energéticamente demandantes, o gastando tiempo persiguiendo o cortejando a hembras no receptivas, pueden llegar a sufrir altos costos energéticos o reproductivos y pueden ver limitado el tiempo destinado a copular (Baruffaldi & Andrade 2015; Byrne & Rice 2006; Kelso & Verrell 2002; Morse 2010; Wedell *et al.* 2002). Además en las especies donde las hembras pueden copular con varias parejas, la competencia espermática podría afectar el éxito reproductivo final de los machos (Elgar 1998). Por lo tanto, es ventajoso para los machos poder distinguir entre hembras que posean diferentes estatus reproductivos y/o receptividad, así llegarían a ser capaces de evaluar los riesgos de la competencia espermática previos a la cópula (Assis *et al.* 2016; Guilford & Dawkins 1991). Consecuentemente, si las diferencias existentes tanto en la calidad o la cantidad de las señales químicas presentes en las telas o en los cuerpos de las arañas, significarían diferencias en el tamaño o en estado reproductivo de las hembras, sería muy ventajoso para los machos poder detectar tales diferencias (Assis *et al.* 2016; Harari & Steinitz 2013).

En las arañas, la comunicación durante el cortejo generalmente es multimodal, incluyendo la emisión y recepción de señales visuales, vibratorias, táctiles y químicas ya sean volátiles o por contacto (Elgar 1998; Foelix 2011; Huber 2005). Las feromonas de contacto que poseen las arañas típicamente están asociadas con la seda, líneas de seda o el sustrato, las feromonas volátiles son emitidas desde la seda o la cutícula del cuerpo (Gaskett 2007; Schulz 2004). Las hembras de las arañas pueden poseer feromonas volátiles, que cumplirían el rol de atraer al macho o inducirían comportamientos de búsqueda, mientras que las feromonas de contacto estimularían al macho a cortejar por medio de comportamientos ritualizados y proveerían

información específica acerca del estatus sexual del emisor (Gaskett 2007). En general, en las arañas, las feromonas volátiles actuarían como atrayentes de largo rango y las feromonas de contacto operarían como señales de corto alcance, ambas clases de señales son percibidas mediante quimiorreceptores presentes en los pedipalpos masculinos (Aisenberg *et al.* 2010; Gaskett 2007).

La importancia que presentan las feromonas en el reconocimiento de las parejas está documentada en numerosas especies y en la actualidad también se ha comprobado su rol de señales e indicadores químicos en la elección de pareja (Johansson & Jones 2007; Steiger & Stökl 2014; Wyatt 2003).

Symonds y Elgar (2008) estimaron que cerca del 80% de las investigaciones realizadas sobre feromonas han sido en insectos, y solo el 1% en arañas. Los pocos estudios realizados dentro de este grupo muestra una amplia evidencia que los machos de las arañas pueden llegar a distinguir entre hembras vírgenes y hembras que ya han sido copuladas (Symonds & Elgar 2008). Ejemplos de este comportamiento se observaron en arañas lobo (Baruffaldi & Costa 2010), viuda negra (Stoltz *et al.* 2007), arañas de telas orbiculares (Schulte *et al.* 2010) y arañas del desierto (Tuni & Berger-Tal 2012).

A pesar de que en los últimos años el conocimiento es mayor dentro de este orden, algunos grupos no hay sido estudiados en profundidad, tal es el caso de las migalomorfas. En un inicio Platnick (1971), divide al cortejo de las arañas en tres niveles, dependiendo del estímulo para el inicio del cortejo del macho; así cataloga a la mayoría de las migalomorfas en arañas de nivel I por comenzar el cortejo luego del contacto del macho con la hembra. Dentro de este nivel sin comunicación quimo táctil incluye a todas la terafósidas (Platnick 1971). Años después Coyle & Shear (1981)

cambian esta visión cuando sugieren, con sus observaciones realizadas en *Sphodros abboti* (Atypidae), que los tubos de seda de las hembras adultas están asociadas con feromonas de contacto que inducen el cortejo de los machos. Luego Gaskett (2007) en su revisión de feromonas sexuales en arañas, enumera los trabajos donde, a través de observaciones indirectas realizadas a campo y en laboratorio, se deduce la presencia de feromonas en la tela de las hembras, mencionando solo a las familias Antrodiaetidae y Theraphosidae. Schulz (2013) dentro de su revisión desde una perspectiva estructural de las feromonas, menciona dos estudios realizado en lípidos presentes en la cutícula de hembras y de compuestos en la tela en dos especies de *Brachypelma* (Theraphosidae), los cuales actúan como mediadores de interacciones intraespecíficas (Dor *et al.* 2008; Trabalon 2011), confirmando así la existencia de feromonas en las hembras y en sus telas. Ferretti y colaboradores (2013), durante la revisión de trabajos de comportamiento reproductivo en varias familias de arañas migalomorfas de los últimos 21 años, indican que la mayoría de estos estudios proponen como forma de comunicación de las parejas, la utilización de señales presentes en la tela de las hembras, posiblemente con feromonas asociadas a ella.

En la descripción del cortejo de *Acanthogonatus centralis* Goloboff 1995 se hace mención del inicio del cortejo del macho previo al contacto con la tela del tubo de seda de la hembra (Ferretti *et al.* 2011). Costa y Pérez-Miles (1992) describen el cortejo y cópula de *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman, 1942) donde el macho, durante la única experiencia, comienza el cortejo luego de tocar a hembra; pero los autores mencionan que en oportunidades anteriores, observaron al macho iniciar el cortejo al tocar seda de una hembra. Las hembras de ambas especies construyen sus

refugios bajo piedra, *A. centralis* realiza tubos de tela (Fig. 1) mientras que *P. longisternale* tapiza con abundante seda la entrada y paredes de su cueva (Fig. 2).

Sobre la base de lo expuesto se plantea la hipótesis que la comunicación sexual en estas arañas migalomorfas es principalmente a través del contacto del macho con seda, previamente depositada por la hembra en su refugio. Estas señales pueden brindarle al macho información de la hembra, como su estatus reproductivo, receptividad o su condición. Así se espera que los machos basen sus esfuerzos reproductivos en hembras que potencialmente aumenten su éxito reproductivo.

## 2. Objetivos

- 2.1. Determinar la existencia de comunicación tacto-química intersexual mediante la presencia de feromonas volátiles y/o de contacto por medio de experiencias de comportamiento.
- 2.2. Analizar la influencia del estatus reproductivo de las hembras en la elección masculina a través de evidencias comportamentales.
- 2.3. Evaluar la posible elección masculina de la condición femenina mediante pruebas comportamentales.



Figura 1. Hembra de *A. centralis* en su tubo de seda. Foto tomada en Sierra de la ventana.



Figura 2. Hembra de *P. longisternale* en su refugio tapizado con abundante seda. A la derecha se observan restos de una exuvia del ejemplar. Foto tomada en Sierra de la ventana.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio

Los machos adultos de *Acanthogonatus centralis* (N=30) se colectaron en la localidad de Sierra de las Ventana (38°04'21.3''S, 62°03'02.6''O), Buenos Aires, durante los meses de mayo y agosto del año 2014. Las hembras (n=20) se colectaron y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio hasta que mudaron y se pudo confirmar su sexo a través de la presencia de espermatecas en la exuvia. Los ejemplares se acondicionaron individualmente en cajas de Petri de plástico con sustrato de tierra y un algodón embebido en agua como bebedero. Los individuos se alimentaron una vez a la semana con *Gryllus assimilis* (Orthoptera, Gryllidae) y *Blatella germanica* (Blattodea, Blatellidae). El fotoperiodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

#### 3.2. Criterios generales de las experiencias

A todos los individuos se les midió el ancho del cefalotórax como medida representativa del tamaño corporal en arañas (Eberhard 1996; Foelix 2011). Las arañas se pesaron con balanza Ohaus PA313 Explorer (precisión 0,001). La temperatura de la habitación durante las experiencias fue de 26.7°C ± 1.52. Todas las interacciones se grabaron usando una cámara digital Panasonic SDR-S7 acoplada a una estructura fija. Los videos se analizaron usando el programa JWatcher 0.9 (Blumstein *et al.* 2000).

Todos los elementos utilizados se lavaron con agua y detergente, secados, rociados con alcohol y secados nuevamente, para asegurarse la correcta limpieza y eliminación de posibles restos de señales entre los ensayos (Dodson *et al.* 2013; Gaskett 2007; Walsh & Rayor 2008).

Se consideró hembra virgen a los ejemplares que luego de su colecta en el laboratorio mudaron al menos una vez. Se consideró hembra copula (N=10) a ejemplares que una semana previa a las experiencias se las cruzó con un grupo de machos no utilizados en estos ensayos. Un stock de veinte machos fue utilizado para cada prueba, no repitiéndose parejas entre los diferentes ensayos. En caso de deceso, los machos fueron reemplazados por uno nuevo del stock de 30 machos originales. Entre los diferentes ensayos, los ejemplares descansaron un mínimo de tres días a un máximo de diez.

### 3.3. *Diseño de experimentos*

#### 3.3.1. *Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles*

Las experiencias se realizaron con un olfatómetro en “Y” de vidrio borosilicato térmico 3.3 Pyrex CGW 7740. El mismo constó de un tubo colector de 35cm y 5 cm de diámetro (brazo de introducción) unido a dos brazos de 20 cm de largo (brazo de elección); todos estos trayectos fueron divididos en regiones (Fig. 3). Los tres extremos se sellaron con tela voile la cual permitió el paso de aire pero impidió el escape de los animales. En una mesa diferente, para evitar un cambio en el comportamiento de los machos ante vibraciones (Aisenberg *et al.* 2010), se colocaron dos ventiladores dirigidos hacia los extremos de ambos brazos de elección. Los ventiladores (8 cm de diámetro) se utilizaron a 2292 r.p.m., produciendo una corriente de aire estable. Previamente al estudio se probaron los ventiladores a diferentes revoluciones y se observó el comportamientos de machos de ambas especies (N=3) con el fin de utilizar la velocidad óptima. Los machos se asignaron al azar a cada tratamiento. Se depositaron cuidadosamente en el brazo de introducción y se les permitió caminar libremente dentro del olfatómetro. Se grabaron los movimientos y los

comportamientos de cada macho y se evaluaron cuatro parámetros: i) primer brazo visitado; ii) tiempo total en cada brazo (permanencia); iii) tiempo total en cada región y iv) tiempo hasta elegir el primer brazo (latencia de elección).

3.3.1.1. *Feromonas volátiles presentes en la cutícula de las hembras de A. centralis*

En una mesa diferente para evitar comunicación sísmica (Quirici & Costa 2005), se colocó entre los brazos de elección y los ventiladores un recipiente de 7 cm de diámetro y 6,5 cm de largo, a una distancia de 1 cm entre cada dispositivo. Cada extremo del recipiente se cubrió con una tela voile. Las hembras se colocaron en los contenedores 30 minutos previos al inicio, los ventiladores se mantuvieron encendidos desde ese momento hasta finalizado los 15 minutos de registro de actividades. Los tratamientos de feromonas cuticulares fueron: macho ante hembra virgen versus control (N=20), macho ante hembra copulada versus control (N=20), macho ante hembra virgen versus hembra copulada (N=20) y machos ante dos controles (N=10). Los controles fueron contenedores vacíos.

3.3.1.2. *Feromonas volátiles presentes en la tela de las hembras de A. centralis*

Las hembras se confinaron en un recipiente limpio por tres días. Toda la seda que la hembra depositó en él, se removió cuidadosamente y se colocó en la parte final de un brazo de elección. Para separar e impedir el contacto de la tela con los machos, un fragmento de tela voile se ubicó 5 centímetros antes del final de cada brazo. Los ventiladores se mantuvieron encendidos desde el ingreso del macho al “brazo de introducción” hasta finalizados los 15 minutos de registro. Los tratamientos de feromonas presentes en la tela fueron: macho ante seda de hembra virgen versus

control (N=20), macho ante seda de hembra copulada versus control (N=20) y macho ante seda de hembra virgen versus seda de hembra copulada (N=20).

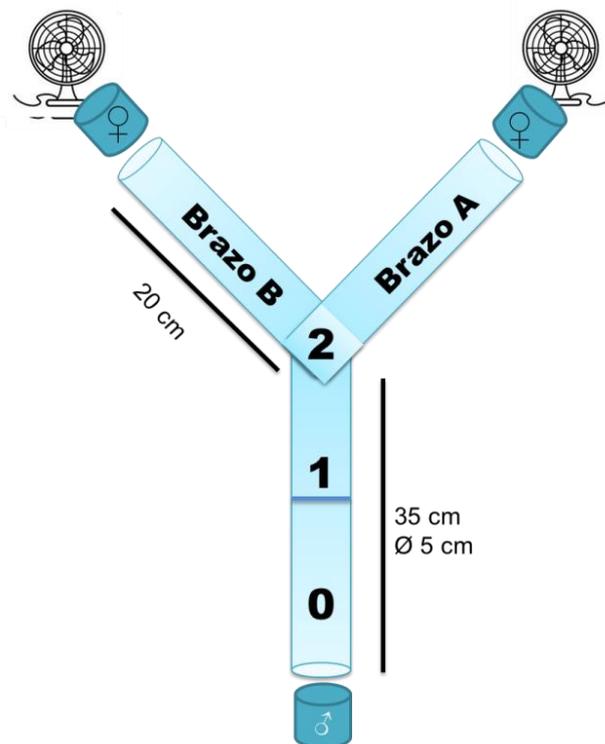


Figura 3. Olfatómetro en “Y”. Tanto ventiladores como recipientes contenedores de las hembras se situaban en otra mesa.

### 3.3.2. Prueba de existencia de feromonas femeninas de contacto en *A. centralis*

Para evaluar la existencia de feromonas femeninas sexuales de contacto se usó una arena de triple elección (Papke *et al.* 2001; Riechert & Singer 1995). El dispositivo contó con tres contenedores plásticos unidos mediante tubos a un contenedor central (Fig. 4). Las hembras se colocaron en contenedores individualmente, la base constó de un papel de filtro donde durante 24 horas pudieron depositar su tela. Unos minutos antes del comienzo del ensayo, se retiró a la hembra y el contenedor con la tela adherida al papel de filtro se lo unió a la triple arena. Luego se liberó al macho en la

cámara central y se analizaron sus movimientos en relación a los movimientos realizados en los tres contenedores con diferentes tratamientos (Riechert & Singer 1995). Se registró: i) latencia (tiempo desde la entrada del macho a un contenedor hasta el inicio del cortejo); tiempo total en cada contenedor; iii) frecuencia de cada comportamiento.

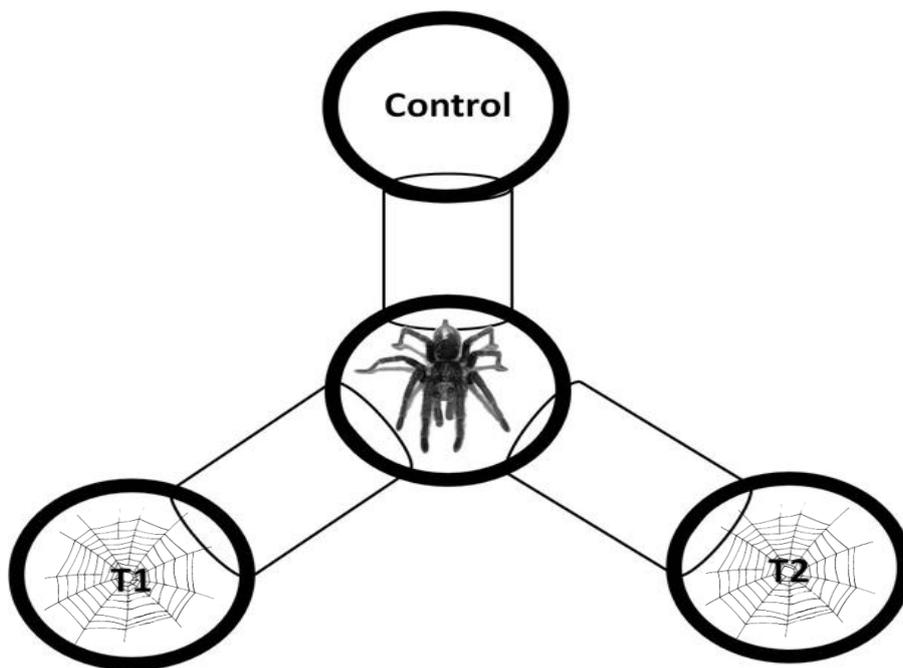


Figura 4. Esquema de la arena de triple elección. T: tratamiento.

La arena contó con contenedores de 7 cm de diámetro y 4 cm de alto unidos a un segmento central por medio de tubos de 3 cm de largo y 1 cm de ancho. Los tratamientos constaron de un macho confrontado durante 20 minutos a: tela de hembra virgen grande versus tela de hembra virgen pequeña versus control (V.p-V.g-C) (N=20); tela de hembra copulada grande versus tela de hembra copulada pequeña versus control (Cop.p-Cop.g-C) (N=20); tela de hembra copulada versus tela de hembra virgen versus control (Cop-V-C) (N=20) y control versus control versus

control (C-C-C) (N=10). Los grupos de hembras pequeñas y grandes contaban con pesos que diferían significativamente (Vírgenes  $t=-7,1691$ ,  $p<0,001$  y Copuladas  $t=-3,73$ ,  $p<0,005$ ). Los controles fueron un contenedor con papel de filtro en su base.

#### *3.4. Análisis estadísticos*

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico PAST v.3.02 (Hammer, Harper & Ryan, 2001) y SPSS 14.0. Se analizó si los datos siguieron una distribución normal usando el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las variancias con el test Levene. Variables que no se ajustaron a la normalidad se analizaron utilizando test no paramétricos (Mann-Whitney U-test para muestras independientes y Wilcoxon signed-rank test para muestras dependientes). Se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se compararon las frecuencias de muestras dependientes con el test global Cochran Q y McNemar. Se realizaron correlaciones de Spearman para ver si tamaño y/o el peso de los individuos se relacionaron con la intensidad del cortejo, las latencias iniciales y los tiempos totales de cortejo. Además se realizaron regresiones lineales con la previa transformación logarítmica (en base 10) de los datos. Las regresiones proporcionan un medio de cuantificar y comparar las diferencias entre las relaciones de la intensidad del cortejo, las latencias iniciales y los tiempos totales de cortejo con una variable de referencia común (el peso de los individuos).

#### 4. Resultados

##### 4.1. *Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles*

###### 4.1.1. *Feromonas volátiles presentes en la cutícula de las hembras de A. centralis*

Los machos de *A. centralis* no mostraron una preferencia en la primera elección del brazo del olfatómetro, no encontrándose diferencias significativas en los tratamientos, Control (test binomial: N=10, p=1); Virgen-Control (test binomial: N=20, p=1); Control-Copulada (test binomial: N=20, p=0,824) y Virgen-Copulada (test binomial: N=20, p=0,481) (Fig. 5).

En el transcurso de los 60 ensayos de existencia de feromonas volátiles, no se observó ningún patrón de comportamiento reproductivo por parte de los machos. Se hallaron diferencias significativas en el tiempo que los machos caminaron por las diferentes regiones (Fig. 6(a-d)). Con respecto al tiempo que los machos transitaron los diferentes brazos, se encontraron diferencias significativa en la proporción de tiempo relativo en el tratamiento Virgen-Control, en el que los machos pasaron más tiempo en el brazo control (Mann Whitney U test,  $z=-2,8816$ ;  $p=0,003956$  (Fig. 7). En el resto de los tratamientos no se encontraron diferencias significativas basadas en 20 ensayos de cada tipo: Control (Mann Whitney U test,  $z=-0,038084$ ;  $p=0,96962$ ); Copulada-Control (Mann Whitney U test,  $z=-0,20299$ ;  $p=0,83914$ ); Virgen-Copulada (Mann Whitney U test,  $z=-0,9919$ ;  $p=0,32125$ ). No se encontraron diferencias en la latencia de elección de los tratamientos, es decir en el tiempo que los machos tardan en elegir un brazo ( $H=1,473$ ;  $p=0,4789$ ), los tiempos medios fueron en Virgen-Control  $58,45 \pm 68,94$  segundos (2,86 - 241,44), en Copulada-Control  $58,05 \pm 82,77$  segundos (2,30 - 280,40) y en Virgen-Copulada  $89,14 \pm 127,59$  segundos (2,02 - 471,76). Además se

pudo observar que durante los días de los ensayos la latencia no disminuyó ( $r_s=0,224$ ;  $p=0,533$ ).

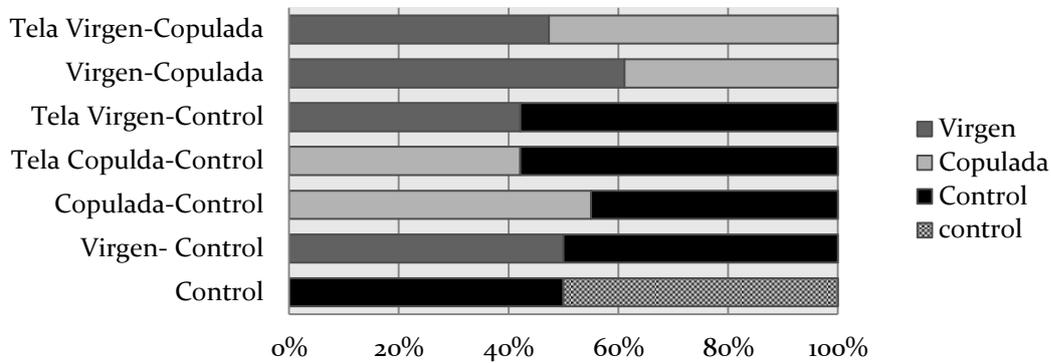


Figura 5. Porcentaje de la primera elección de tratamiento de los machos de *A. centralis*.

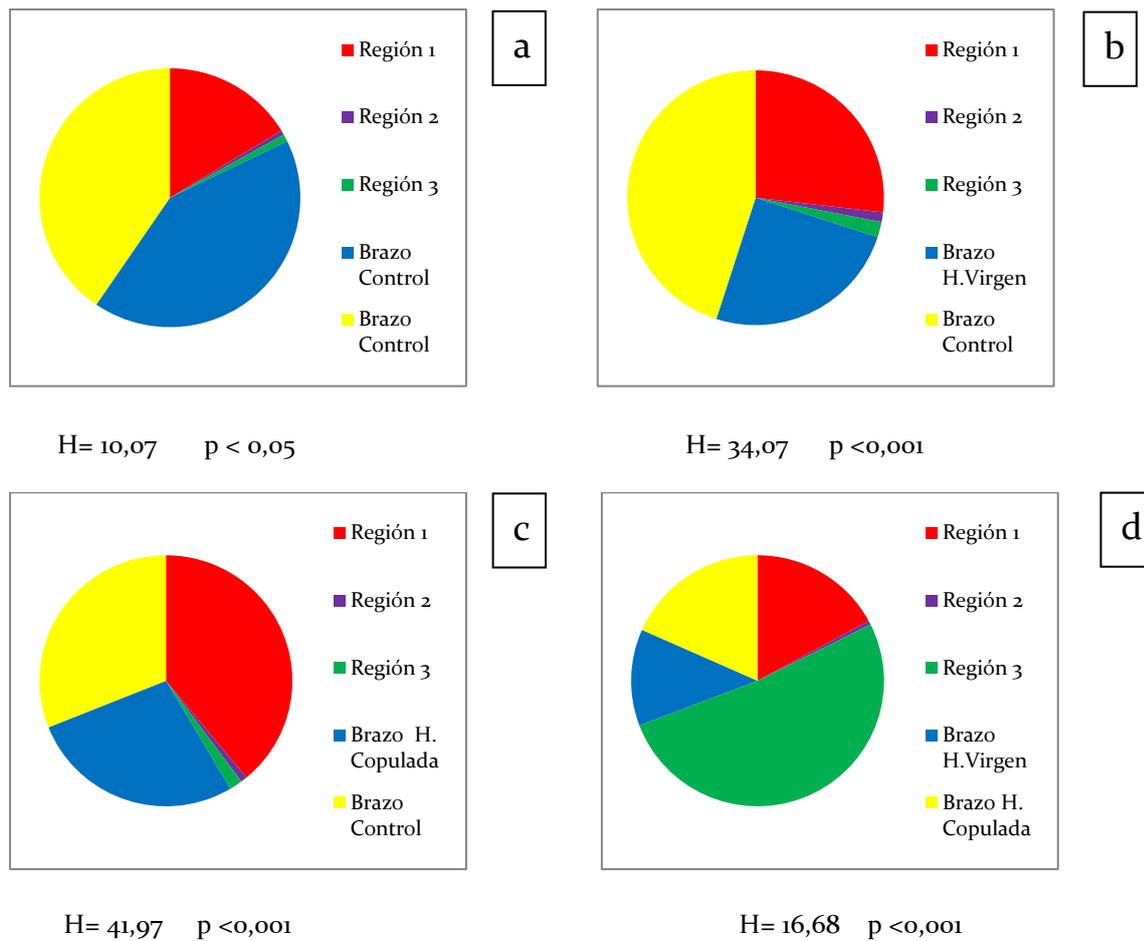


Figura 6. Porcentajes de tiempo que los machos de *A. centralis* caminaron por cada región y su estadístico. **a**: Control; **b**: Virgen-Control; **c**: Copulada-Control y **d** Virgen-Copulada.

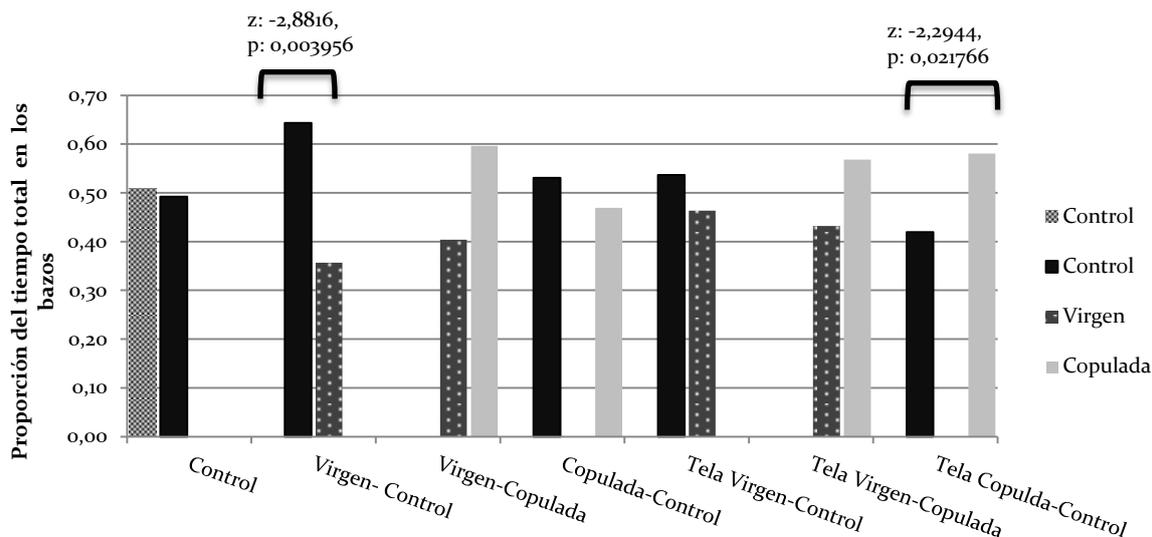


Figura 7. Tiempo utilizado por los machos de *A. centralis* en el brazo tratamiento versus el brazo control como proporción del tiempo total transcurrido en ambos.

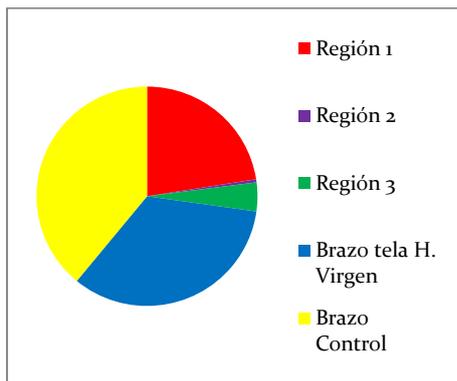
#### 4.1.2. Feromonas volátiles presentes en la tela de las hembras de *A. centralis*

Los machos de *A. centralis* no mostraron una preferencia en la primera elección del brazo del olfatómetro, no encontrándose diferencias significativas en los tratamientos Tela H. Virgen- Control (test binomial: N=20, p=0,648); Tela H. Copulada-Control (test binomial: N=20, p=0,648) y Tela H. Virgen-Tela H. Copulada (test binomial: N=20, p=1) (Fig. 5).

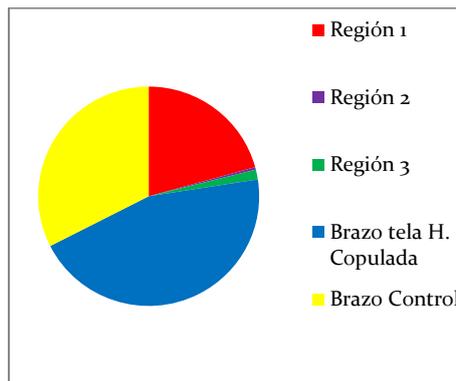
En el transcurso de los 60 ensayos de existencia de feromonas volátiles presentes en la tela de las hembras, no se observó ningún patrón de comportamiento reproductivo por parte de los machos.

Se hallaron diferencias significativas en el tiempo que los machos caminaron por las diferentes regiones (Figura 8 (a-c)). Con respecto al tiempo que los machos transitaron los diferentes brazos, se encontraron diferencias significativa en la proporción de tiempo relativo en el tratamiento H. Tela Copulada-Control (Mann Whitney U test, z=-2,2944; p=0,021766) donde los machos pasaron más tiempo en el

brazo con tela de hembra copulada (Fig. 7). En el resto de los tratamientos no se encontró diferencias significativas basadas en 20 ensayos de cada tipo: Tela H. Virgen-Control (Mann-Whitney U test,  $z=-1,3936$ ,  $p=0,16344$ ) y Tela H. Virgen- Tela H. Copulada (Mann Whitney U test,  $z=-1,1636$ ,  $p=0,24457$ ). No se encontraron diferencias en la latencia de elección de los tratamientos, es decir en el tiempo que los machos tardan en elegir un brazo ( $H=0,7211$ ;  $p=0,6973$ ), los tiempos medios fueron en Tela H. Virgen-Control  $58,40 \pm 109,53$  (1,78 - 402,38) en Tela H. Copulada-Control  $105,91 \pm 225,80$  (1,49 - 899,59) y en Tela H. Virgen- Tela H. Copulada  $44,91 \pm 84,67$  (1,22 - 319,76). Además se pudo observar que durante los días de los ensayos la latencia no disminuyó ( $r_s=0,2619$ ;  $p=0,53641$ ).



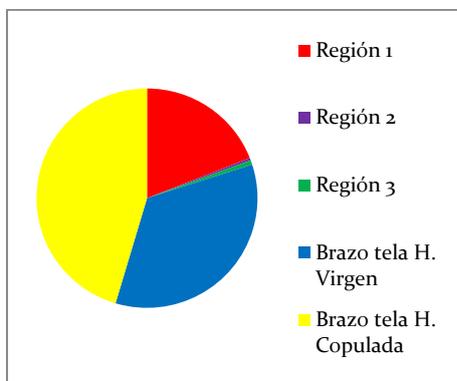
a



b

$H= 33,96$   $p <0,001$

$H= 34,02$   $p <0,001$



c

$H= 41,32$   $p <0,001$

Figura 8. Porcentajes de tiempo que los machos de *A. centralis* caminaron por cada región y su estadístico. **a:** Tela H. Virgen-Control Control; **b:** Tela H. Copulada-Control y **c:** Tela H. Virgen-Tela H. Copulada.

#### 4.2. Prueba de existencia de feromonas femeninas de contacto en *A. centralis*

Los machos recorrieron los tres diferentes tratamientos del grupo Control en todos los ensayos (100%), en un 45% del grupo V.p-V.g-C, en un 25% del grupo Cop.p-Cop.g-C y en un 55% del grupo V-Cop-C. En las arenas de contacto el 95% de los machos cortejó (unidad de cortejo: rasgar) sobre seda de hembra virgen y hembra copulada (n=60). Los machos cortejaron al menos en uno de los tratamientos: en el grupo V.p-V.g-C el 75% de los casos (n=20), en el grupo Cop.p-Cop.g-C el 90% (n=20) y en el grupo C-V-Cop el 95% (n=20). Ningún macho cortejó sobre el tratamiento control. Se encontraron diferencias significativas en la ocurrencia de cortejo por parte de los machos en los tres tratamientos (Fig. 9), no se registraron diferencias en la frecuencia de cortejo entre los tratamientos Virgen pequeña/grande (test de McNemar, N=20, p=0,508), Copulada pequeña/grande (test de McNemar, N=20, p=1), pero la ocurrencia de cortejo fue mayor en el tratamiento “Virgen” en el grupo Virgen/Copulada (test de McNemar, N=20, p=0,02).

Cuando se compara el tiempo promedio relativo que los machos de *A. centralis* permanecen en cada tratamiento podemos observar que no se hayan diferencias en el grupo C-C-C (H=0,1376; p=0,9335) y en el grupo V.p-V.g-C (H=4,474; p=0,103). Se hallaron diferencias dentro del grupo Cop.p-Cop.g-C (H=8,989; p=0,007684) donde los machos pasaron más tiempo en los tratamientos de hembras copuladas que en el tratamiento “control” (Copulada pequeña- Copulada grande (z=0,30305; p=0,76185), Copulada pequeña- Control (z=3,241; p=0,0011912) y Copulada grande-Control (z=3,241;

p=0,002545). Dentro del grupo V-Cop-C (H=23,71; p<0,001) los machos pasaron más tiempo en el tratamiento “Virgen” (z=3,0693; p=0,0021456) (Fig. 10).

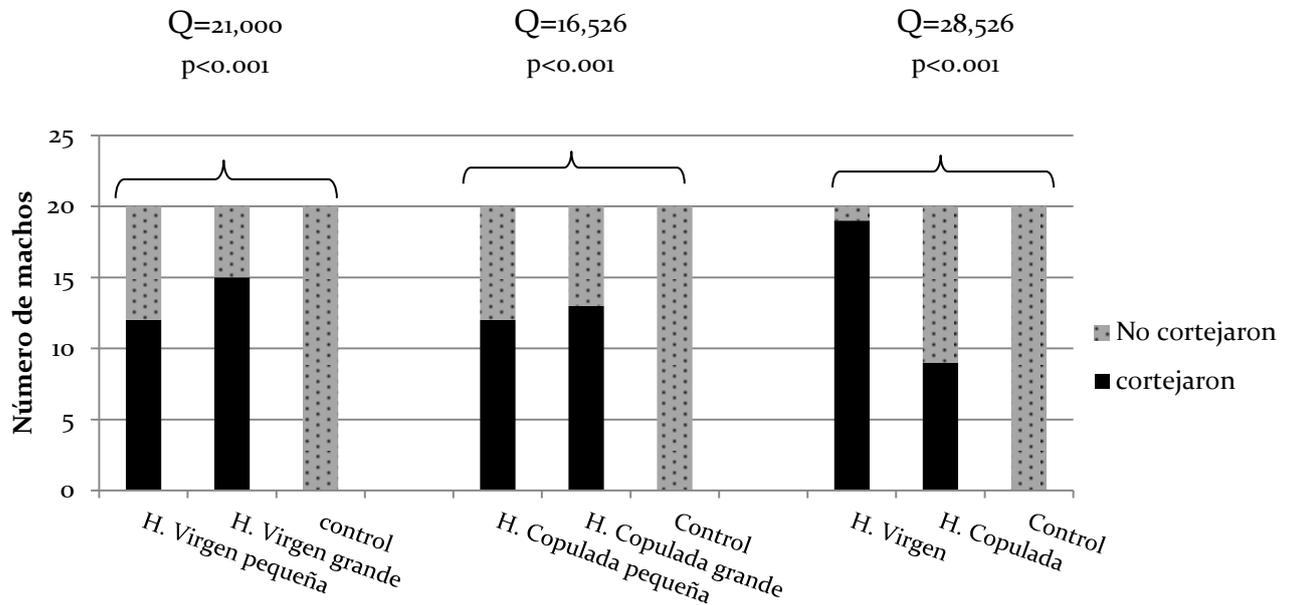


Figura 9. Ocurrencia de cortejo de los machos de *A. centralis* para los diferentes tratamientos. Se muestran los resultados del test de Cochran.

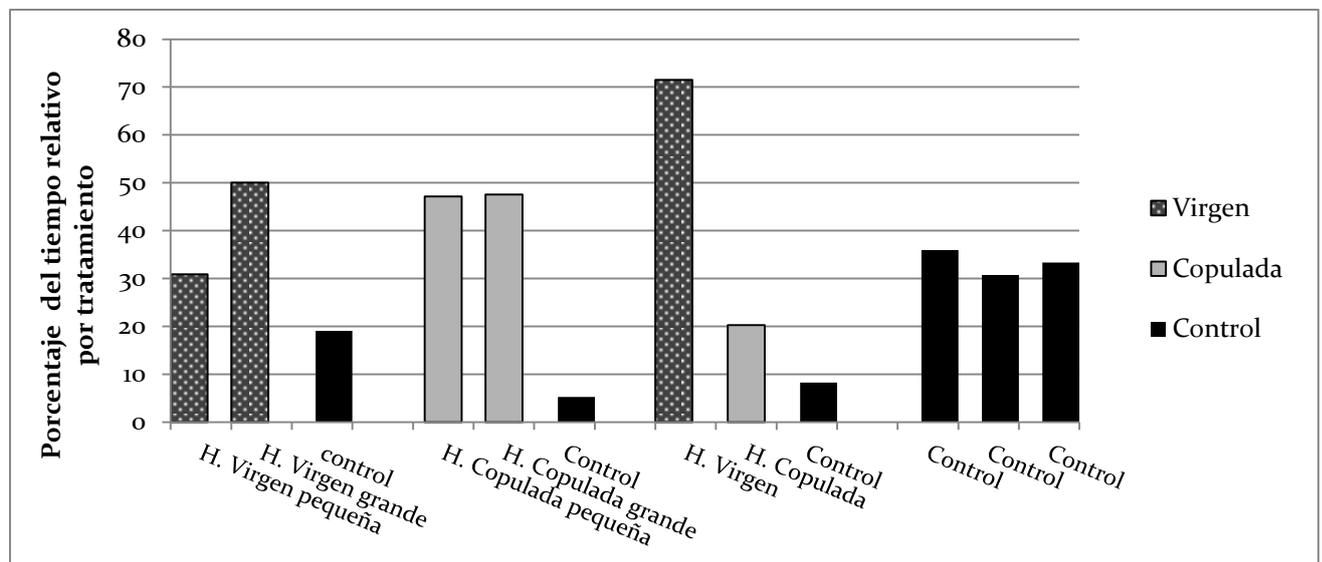


Figura 10. Comparación del tiempo promedio que los machos de *A. centralis* permanecieron en cada tratamiento en los diferentes grupos.

Con respecto a la latencia, es decir al tiempo desde que los machos de *A. centralis* ingresan en el contenedor con un tratamiento hasta el momento que inician el cortejo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $H=9,471$ ;  $p=0,09168$ ) (Fig. 11). Los machos no mostraron una diferencia en la cantidad de “rasgueos” entre los tratamientos “pequeña” y “grande” de los grupos V.p-V.g-C y Cop.p-Cop.g-C ( $N=20$ ;  $z=1,4154$ ;  $p=0,15696$  y  $N=20$ ;  $z=0,44266$ ;  $p=0,65801$ , respectivamente). Dentro del grupo V-Cop-C los machos realizaron más rasgueos de tela en el tratamiento “Virgen” ( $N=20$ ;  $z=2,8776$ ;  $p=0,004007$ ). El número medio de rasgueos, error estándar y valores máximos y mínimos se muestran en la tabla 1.

El peso de las hembras no se correlacionó significativamente con el número de rasgueos realizados por los machos en los diferentes tratamientos (V.p-V.g-C:  $r_s=-0,22$ ;  $p=0,915$ ; Cop.p-Cop.g-C:  $r_s=0,095$ ;  $p=0,638$ ; V-Cop-C:  $r_s=-0,291$ ;  $p=0,133$ ). Tampoco se encontraron valores de correlación significativa entre el largo total de la hembras con la cantidad del patrón de comportamiento rasgueo realizado por los machos en los tres grupos (V.p-V.g-C:  $r_s=-0,062$ ;  $p=0,782$ ; Cop.p-Cop.g-C:  $r_s=0,050$ ;  $p=0,837$ ; V-Cop-C:  $r_s=-0,235$ ;  $p=0,258$ ). Los pesos de los machos no se correlacionaron con las variables medidas (tiempo total, rasgueos de la tela y latencia de cortejo) en ninguno de los tres grupos (tabla 2). Tampoco se encontraron asociaciones significativas entre el peso de los machos con el tiempo total, los rasgueos de la tela y latencia de cortejo (Tabla 3).

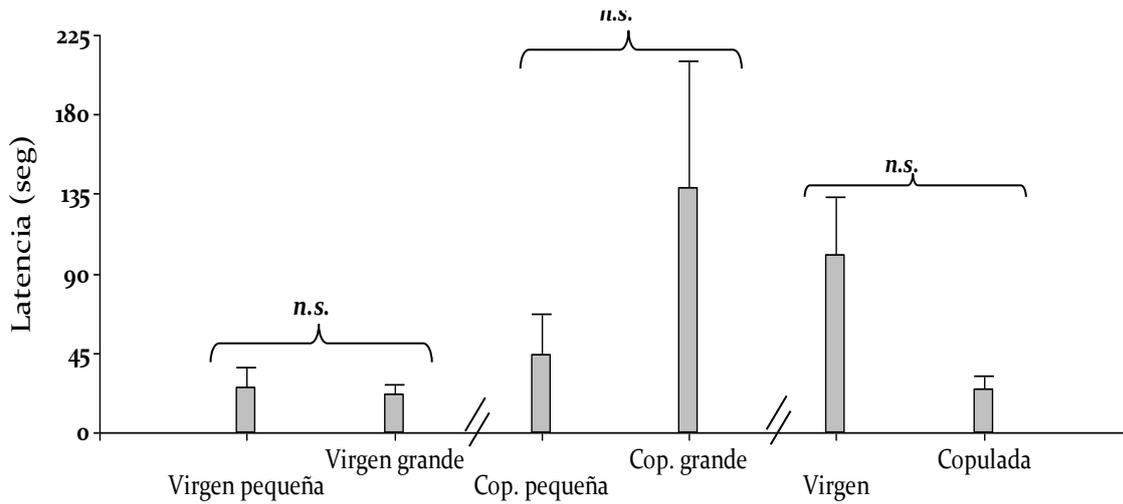


Figura 11. Duración de la período desde que los machos de *A. centralis* entran al tratamiento hasta el comienzo del cortejo. Se muestra el resultado de la comparación estadísticas entre los tiempos en segundos en cada grupo. El tratamiento control no se representa por no poseer cortejos por parte de los machos en éste.

Tabla 1. Valores medios, error estándar y rango de la cantidad acciones de la unidad de cortejo “rasgar” realizado por los machos de *A. centralis* en las arenas de contacto.

Grupos	Media ± Desvío Estándar	Rango
<b>Virgen -Virgen -Control</b>		
Pequeña (12)	30,91 ± 28,91	(4-97)
Grande (15)	46,47 ± 36,96	(2-107)
<b>Copulada -Copulada -Control</b>		
Pequeña (12)	72,25 ± 63,37	(17-229)
Grande (13)	82,77 ± 56,68	(19-216)
<b>Virgen -Copulada -Control</b>		
Virgen (19)	80,32 ± 50,30	(3-181)
Copulada (9)	48,56 ± 54,72	(1-165)

Tabla 2. Asociaciones entre el tiempo total en los contenedores con tratamiento, latencia de cortejo y número total de unidades de cortejo realizadas versus el peso de los machos de *A. centralis*. Datos del peso dados como media  $\pm$  desvío estándar.

Correlaciones	Virgen-Virgen-Control	Copulada-Copulada-Control	Virgen-Copulada-Control
Peso de los machos (gr.)	0,24925 $\pm$ 0,0606	0,24935 $\pm$ 0,062	0,2521 $\pm$ 0,0619
Tiempo total	$r_s=0,12782$ $p=0,59125$	$r_s=-0,02783$ $p=0,90728$	$r_s=-0,043609$ $p=0,85515$
Latencia de inicio	$r_s=0,079492$ $p=0,73903$	$r_s=-0,37096$ $p=0,10735$	$r_s=-0,067669$ $p=0,77682$
“rasgueo” de tela	$r_s=0,15118$ $p=0,52461$	$r_s=0,02783$ $p=0,90728$	$r_s=-0,067132$ $p=0,77855$

Tabla 3. Valores obtenidos a partir del análisis de regresión lineal de las variables comportamentales y el peso de los machos de *A. centralis* en los tres grupos de feromonas de contacto.

		R <sup>2</sup>	Pendiente	Error Estándar	F	P
<b>Virgen-Virgen-Control</b>						
Peso de los machos	Tiempo Total	0,01471	0,79327	1,5302	0,2687	0,6105
	Rasgueos de Tela	0,004576	0,43776	1,5218	0,08275	0,7769
	Latencia	0,002042	0,30446	1,5866	0,03682	0,85
<b>Copulada- Copulada- Control</b>						
Peso de los machos	Tiempo Total	0,001263	0,046923	0,31103	0,02276	0,8818
	Rasgueos de Tela	0,008	0,4535	1,1903	0,1452	0,7077
	Latencia	0,06373	-2,0301	1,8341	1,225	0,2829
<b>Copulada- Virgen- Control</b>						
Peso de los machos	Tiempo Total	0,003644	-0,40427	1,5756	0,06584	0,8004
	Rasgueos de Tela	0,0005521	-0,11863	1,1897	0,009944	0,9217
	Latencia	0,001889	-0,263	1,4249	0,03407	0,8556

## Datos complementarios

### Prueba de existencia de feromonas femeninas volátiles y de contacto en *Plesiopelma longisternale*

En la localidad de Sierra de la Ventana (38°04'21.3''S, 62°03'02.6''O), Buenos Aires, se colectaron machos inmaduros (n=4) y hembras (n=8) durante los meses de abril a julio del 2013. Cada ejemplar se acondicionó en recipientes individuales de plástico (10 cm diámetro x 5 cm), con base de tierra y un pequeño recipiente como bebedero. Los individuos se mantuvieron en el laboratorio hasta obtener hembras vírgenes y machos adultos para los ensayos. Tanto juveniles como adultos se alimentaron semanalmente con *Gryllus assimilis* (Orthoptera, Gryllidae) y *Blatella germanica* (Blattodea, Blatellidae). El fotoperiodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

Siguiendo los mismos protocolos expuestos en los puntos 3.3.1 y 3.3.2, se realizaron los siguientes ensayos:

*Feromonas volátiles en las hembras:* macho ante hembra virgen versus control (N=4), macho ante hembra copulada versus control (N=4), macho ante hembra virgen versus hembra copulada (N=4) y machos ante dos controles (N=4). Los controles fueron contenedores vacíos. Duración 20 minutos. Los machos de *P. longisternale* no mostraron una preferencia en la primera elección del brazo del olfatómetro, Control 50/50; Virgen-Control 75/25; Copulada-Control- 25/75 y Virgen-Copulada 50/50. En el transcurso de los 16 ensayos de existencia de feromonas volátiles, no se observó ningún patrón de comportamiento reproductivo por parte de los machos.

Se hallaron diferencias significativas en el tiempo relativo que los machos caminaron por las diferentes regiones (Fig. 12(a-d)). Con respecto al tiempo relativo

que los machos transitaron los diferentes brazos, se no encontraron diferencias significativa ante los diferentes estímulos (Fig. 13).

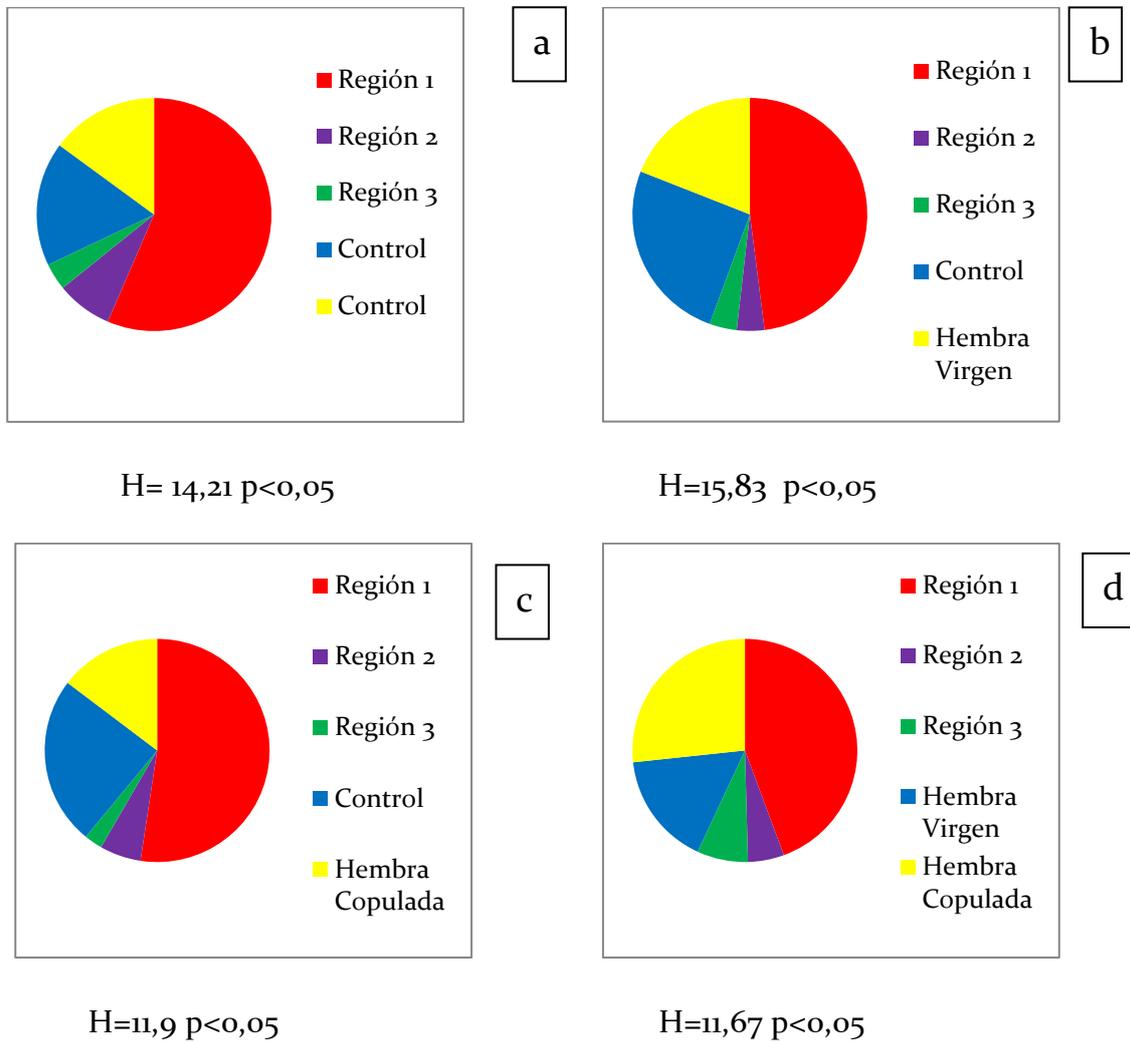


Figura 12. Porcentajes de tiempo que los machos de *P. longisternale* caminaron por cada región. **a**: Control; **b**: Virgen-Control; **c**: Control-Copulada; **d**: Virgen-Copulada.

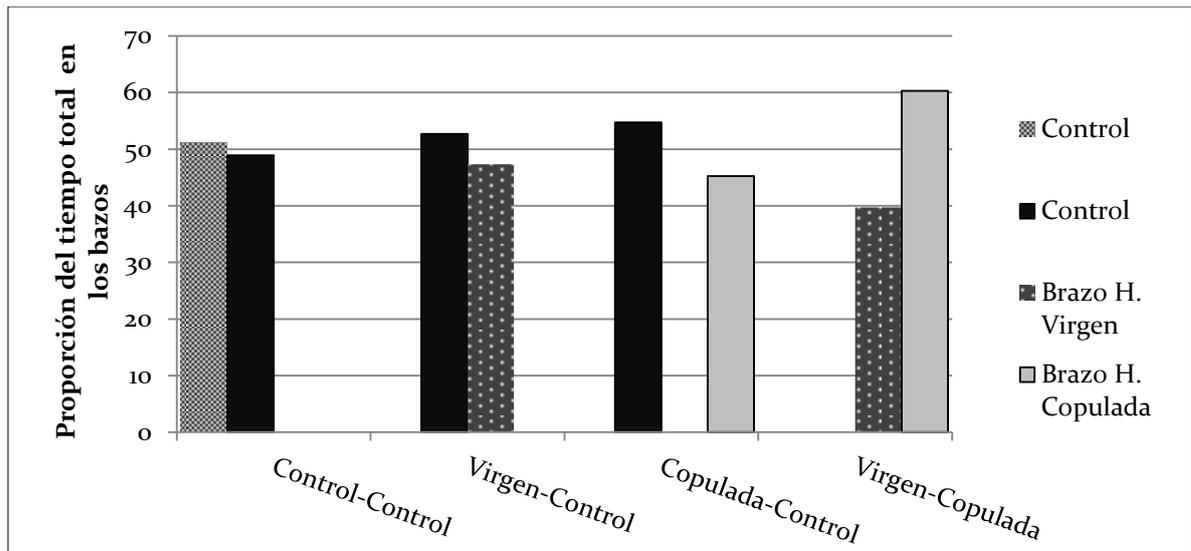


Figura 13. Tiempo utilizado por los machos de *P. longisternale* en el brazo tratamiento versus el brazo control o tratamiento como proporción del tiempo total transcurrido en los dos brazos.

*Feromonas de contacto presentes en la tela de las hembras:* la arena contó con contenedores de 10 cm de diámetro y 7 cm de alto unidos a un segmento central por medio de tubos de 7 cm de largo y 4 cm de ancho. Los tratamientos constaron de un macho confrontado durante 30 minutos a: tela de hembra copulada versus tela de hembra virgen versus control (Cop-V-C) (N=4) y control versus control versus control (C-C-C) (N=4). Los machos cortejaron ante el estímulo de tela femenina sobre papel. Como unidad de cortejo se registró las vibraciones del cuerpo. Ningún macho cortejo sobre el control. Los machos no mostraron una diferencia en la cantidad de “vibraciones” entre los tratamientos Virgen ( $15,5 \pm 12,06$ ) y Copulada ( $27,8 \pm 14,20$ ) del grupo V-Cop-C ( $z=-0,9839$ ;  $p=0,32516$ ). Cuando se compara el tiempo promedio relativo que los machos de *P. longisternale* permanecen entre los tratamientos Virgen y Copulada no se encontraron diferencias ( $z=-0,1479$ ;  $p=0,88242$ ).

## 5. Discusión

Este estudio permite confirmar que dentro de la comunicación entre machos y hembras de *Acanthogonatus centralis* no intervienen señales químicas aéreas. No se registraron evidencias comportamentales de los machos que indiquen una elección preferencial hacia alguno de los estímulos ofrecidos durante los ensayos. Los machos no muestran una primera elección positiva hacia las hembras o sus telas y después de esta carencia inicial de respuesta tampoco presentan una predilección en cuanto al tiempo que trascurren en cada brazo del olfatómetro manifestando una ausencia de interacción con los tratamientos. Esta falta de comunicación podría deberse ya sea a una ausencia de señales químicas volátiles en las hembras y sus telas o a una incapacidad de los machos a detectar dichos señales.

La cutícula externa de las arañas está cubierta por una capa cerosa compuesta de un mix de lípidos hidrofóbicos, su principal propósito es mantener un correcto balance de agua y prevenir la desecación pero secundariamente participan en la comunicación química como feromonas (Trabalon & Bagnères 2010). Dado que las glándulas de secreción de feromonas en arañas no son conocidas se cree que las feromonas presentes en la seda podrían ser producidas en las glándulas mismas de seda (Schulz 2004) o ser originadas en la cutícula de la hembra y trasladadas a la seda durante la construcción de la tela (Trabalon *et al.* 2005). Dentro del grupo de las Araneomorfas, las feromonas volátiles presentes en la cutícula de las hembras han sido identificadas químicamente y testeadas en varias especies como: *Agelenopsis aperta* (Agelenidae: Papke *et al.* 2001) los compuestos atrajeron y dispararon el cortejo de los machos y en *Argiope bruennichi* (Araneidae: Chinta *et al.* 2010) y en *Pholcus beijingensis* (Pholcidae: Xiao *et al.* 2009) la feromona atrajo a los machos hacia el

estímulo. En cuanto a las migalomorfas solo estudios realizados en hembras de *Brachypelma albopilosum* (Theraphosidae) comprueban la existencia de compuestos químicos cuticulares que median la comunicación entre co-específicos y que son dependientes del estado de nutrición de las hembras pero no se dan detalles de la volatilidad de los mismos (Trabalón 2011). Con respecto a los machos solo Schulz (2004) mostró que los machos de *Hadronyche infensa* (Hexathelidae) son atraídos por compuestos volátiles de la hembra y que este tipo de comportamiento se utilizó en la construcción de trampas para coleccionar machos usando hembras escondidas. Pero cuando se analiza el tipo de trampa (Hickman 1964) se puede observar que la comunicación sísmica no se encuentra aislada y que seguramente fue la vía principal de atracción para el macho (Quirici & Costa 2007). Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo observado en varias familias de migalomorfas, donde el encuentro del macho con las hembras o el inicio del cortejo es por medio de otros canales de comunicación y no a través de feromonas volátiles (Costa *et al.* 2013a; Ferretti *et al.* 2013a; Gaskett 2007). Así, los machos de *Mecicobothrium thorelli* (Mecicobothriidae) se comunican con la hembra a través de vibraciones en la tela (Costa & Perez-Miles 1998; Ferretti *et al.* 2013a) y los machos de *Eupalaestrus weijenberghi* (Theraphosidae) y *Acanthoscurria suina* (Theraphosidae) comienzan el cortejo luego del contacto con la tela en la entrada de la cueva de las hembras y la pareja interactúa mediante el uso de la comunicación sísmica (Costa *et al.* 2013a). De acuerdo a lo observado se podría inferir que las hembras de *P. longisternali* tampoco poseen feromonas volátiles en su cutícula.

Por otro lado los machos de *A. centralis* en los ensayos de feromonas de contacto presentaron una preferencia significativa hacia los contenedores donde los papeles de filtro contaban con la presencia de tela de hembras en lugar de los contenedores con solo papel, esto indicaría la utilización de señales tacto-químicas en la tela que modularían la comunicación en la búsqueda de pareja (Wyatt 2003). Seguido de que en los controles, es decir, papeles de filtro donde las hembras nunca estuvieron presentes y no contenían hilos de seda, no se observó cortejo de los machos además que los ejemplares permanecieron menos tiempo en ellos. El uso de feromonas de contacto en la tela provee a las hembras la ventaja de una continuidad emisión de señales sin la necesidad de liberar activamente feromonas desde glándulas, obstaculizando otras actividades como la captura de presas (Gaskett 2007).

Los machos de *A. centralis* mostraron esfuerzos diferenciales en el cortejo, se observó que la unidad rasgar (movimiento hacia delante y atrás de pata I y II extendidas) ocurre con mayor frecuencia en los tratamientos de tela de las hembras vírgenes más que en los de tela de las hembras copuladas, además que la ocurrencia de cortejo y el tiempo promedio también fue superior en estos ensayos. Estos resultados muestran que los machos han desarrollado la capacidad de diferenciar entre ellas por medio de entrar en contacto con sus telas teniendo una preferencia sobre las hembras vírgenes. Esto sugiere que las hembras pueden advertir sobre estatus reproductivo y los machos han evolucionado con la habilidad para explotar las señales químicas/físicas de la tela de la hembra adquiriendo información sobre el estatus reproductivo y la receptividad para aparearse. Estudios en otras especies de arañas mostraron que los machos se inclinan más a cortejar hembras vírgenes antes que hembras que ya hayan copulado y que esos machos usaron químicos unidos a la tela

de las hembras para discriminar entre los estatus (Baruffaldi & Costa 2010; Riechert & Singer 1995; Stoltz *et al.* 2007; Tuni & Berger-Tal 2012). La elección de una hembra virgen tiene como beneficios la reducción del riesgo al rechazo femenino, la reducción de la competencia espermática y el incremento de la paternidad (Aisenberg & Costa 2005; Baruffaldi & Costa 2014; Bonduriansky 2001; Pérez-Miles *et al.* 2007; Wedell *et al.* 2002). Los machos de ambas especies siguen cortejando ante hembras ya copuladas, ya que a mayor número de cópulas su éxito reproductivo aumenta (Andersson 1994; Bateman 1948). Además la continuidad de las señales en la tela de la hembra luego de una cópula las favorece con nuevos eventos reproductivos y trae consigo los beneficios de la poliandria: competencia espermática, reducción del riesgo a la endogamia e incremento de la diversidad genética de la descendencia, entre otras (Hosken & Stockley 2003). Aunque exista la preferencia de los machos hacia las hembras vírgenes, quizás debido a una alta receptividad de las mismas, *A. centralis* posee espermatecas “*cul-de-sac*” con prioridad último macho o mix de esperma, por lo que se esperaría que los machos copulen con la mayor cantidad de hembras posibles (Uhl 2000).

Aunque existe una amplia correlación entre peso y fecundidad en las hembras y la elección del macho a estas características (Huber 2005), en *A. centralis* el esfuerzo en el cortejo de los machos se relacionó directamente con el estatus de las hembras. Los machos no mostraron una predilección a la tela de hembras con un mayor peso corporal dentro de los dos grupos.

A través de este estudio podemos confirmar que la tela de las hembras brinda información a los machos y que hace posible la comunicación entre ellos. Aunque no se haya aislado la feromonas asociada a la tela, dentro de las arañas la ausencia de estos compuestos químicos es poco común. Como el raro ejemplo de los machos de

*Misumena vatia* (Thomisidae) que pueden distinguir diferencias en el sexo y estatus basados solo en las propiedades de la tela y no en la percepción de feromonas (Anderson & Morse 2001; Leonard & Morse 2006). En este caso el solo contacto con la seda puede servir como una señal indicadora de la presencia de una pareja co-específica y la forma y comportamiento físico de la tela pueden conferir señales específicas (Schulz 2004). Por otro lado, de las feromona de contacto reportada para las terafósidas se sabe, que una de ellas es una sustancia polar soluble en aceto-nitrilo que dispara el cortejo del macho (Fukushima *et al.* 2003), y que la segunda es una feromona de contacto resistente al agua, posiblemente como adaptación a los días de búsqueda de pareja que son lluviosos o de tormenta (Costa *et al.* 2015). Y aunque no existen estudios de aislamiento y posterior comprobación de su efecto, la suposición de la presencia de feromonas de contacto presentes en la tela de las hembras dentro de este grupo en estudio sería correcta.

Al igual que varias arañas migalomorfas (Costa & Pérez-Miles 2002; Dor *et al.* 2008; Gaskett 2007), *A. centralis* y *P. longisternale* depositarían feromonas sobre el tubo de seda o la tela que cubre la entrada de su cueva y de esta manera los machos que caminen en la cercanía podrían reconocer la presencia de una posible pareja por los rastros de tela. Este estudio sugiere que a pesar que las señales vibratorias de la hembra son usadas en etapas tempranas del cortejo en varias migalomorfas (Ferretti *et al.* 2013a), las feromonas asociadas a la tela de las hembras de *A. centralis* brindarían información importante del estatus reproductivo de la hembra y funcionarían como atractivos y desencadenantes del cortejo del macho.

Capítulo III

## Transferencia de esperma

## 1. Introducción

El principio de Bateman argumenta que el éxito reproductivo de los machos solo sería limitado por el número de hembras que puede inseminar, mientras que el éxito reproductivo de las hembras sería independiente del número de machos con los que ella puede copular (Bateman 1948). Tras cada apareamiento, los machos obtienen la posibilidad de alcanzar la paternidad sobre esa descendencia, y de esta manera, pueden incrementar su fitness copulando con varias hembras, lo que resulta en altas tasas de apareamiento, las cuales a su vez, están relacionadas con altas tasas de éxito reproductivo masculino (Andersson 1994; Bateman 1948). Por el contrario, las hembras podrían maximizar su éxito reproductivo incrementando el número de gametos viables (Andersson 1994; Arnqvist & Nilsson 2000; Trivers 1972). Esta asimetría entre los sexos sugiere que el fitness del macho incrementa monotónicamente con el aumento en la tasa de apareamientos, mientras que una o pocas cópulas son suficientes para que las hembras maximicen su éxito reproductivo (Arnqvist & Nilsson 2000; Pizzari & Wedell 2013; Simmons 2005). Sin embargo, las hembras de la mayoría de las especies de animales aceptan múltiples cópulas, las cuales pueden ser con más de un macho (poliandria) o con el mismo macho (apareamientos múltiples) (Birkhead & Pizzari 2002; Simmons 2005; Taylor *et al.* 2014). A pesar que la poliandria le otorga beneficios a las hembras (ver más abajo), también trae costos asociados; por ejemplo, las expone a enfermedades (Thrall *et al.* 2000); incrementa el riesgo a depredación (Rowe 1994); disminuye el tiempo de alimentación e incluso produce daños físicos (Arnqvist & Nilsson 2000; Arnqvist & Rowe 2005). Los beneficios de la poliandria se pueden dividir en beneficios directos e indirectos. Dentro de los beneficios directos que provee la poliandria se encuentra un incremento de la fertilidad y fecundidad

(Andersson 1994; Kvarnemo & Simmons 2013). Por otro lado, entre los beneficios indirectos, se puede mencionar el aumento de la viabilidad en la descendencia; el incremento de la resistencia a parásitos en la descendencia y también el crecimiento de la atractividad de los hijos en las subsiguientes generaciones (Andersson 1994; Fisher 1930; Zahavi 1975).

Tradicionalmente el concepto de selección sexual de Darwin, donde los machos compiten por el acceso a las hembras y las hembras eligen a los machos basados en las características hace referencia al momento previo a la cópula (Darwin 1871). Sin embargo, uno de los efectos más relevantes de la poliandria es que posibilita que la selección sexual continúe después de la cópula (Turnell & Shaw 2015). Esta selección tendría lugar tanto por competencia espermática como por elección críptica femenina (Arnqvist & Rowe 2005) (ver Introducción General). Una de las hipótesis del origen de la elección críptica femenina sugiere que ésta evolucionó en respuesta a las cópulas controladas por los machos (Thornhill & Alcock, 1983; Eberhard, 1996). Largas cópulas en los machos se pueden relacionar con un incremento en su éxito de fertilización debido a un aumento del espermia transferido (Elgar 1995). En las hembras largas cópulas se traducen a reducción del tiempo para alimentarse, incremento del riesgo a depredación, daños y parásitos además de la disminución del control sobre la fertilización y la elección de pareja (Anderson & Hebets 2017; Arnqvist & Rowe 2013).

En arañas, la duración de las cópulas varía dentro y entre las especies (Elgar 1995). Duraciones prolongadas que exceden el tiempo de transferencia espermática sugieren otras funciones de las cópulas (Elgar 1995). Eberhard (1996) ha postulado desde una perspectiva de elección femenina que los machos cortejan a las hembras durante la cópula con el fin de que su espermia sea elegido para la fertilización de los

óvulos. Por otro lado, en un contexto de competencia espermática, durante la cópula un macho podría manipular el esperma de cópulas previas (Elgar 1995). Los machos han adaptado su morfología y/o comportamiento sexual para maximizar las chances de que su esperma sea aceptado por una hembra, entre las estrategias podemos mencionar el control del tiempo invertido en el cortejo, el aumento de la duración total del apareamiento, la transmisión de sustancias inhibidoras de la receptividad sexual, el cuidado de la pareja, el depósito de tapones genitales y la remoción de esperma de machos anteriores (Aisenberg & Eberhard 2009; Calbacho-Rosa *et al.* 2013; Eberhard 1996; Elgar *et al.* 2003; Schneider & Elgar 2001). Dentro del grupo de arañas migalomorfas las duraciones de las cópulas son muy variadas, desde unos pocos segundos a cópulas de más de una hora, pero no existen estudios que relacionen la duración de la cópula con el éxito reproductivo de los machos (Costa & Pérez-Miles 2002; Ferretti *et al.* 2013a; Jackson & Pollard 1990).

Los machos de las arañas migalomorfas presentan en el último segmento del palpo una modificación usualmente de forma simple que actúa como reservorio del esperma hasta la cópula (Foelix 2011). El tarso del palpo, llamado cymbium, tiene una extensión que consiste en un bulbo piriforme que contiene internamente un ducto en espiral que abre a través de un pequeño poro en la punta o émbolo (Costa-Schmidt *et al.* 2017; Foelix 2011). Los machos cuando alcanzan la madurez sexual cargan sus bulbos palpales con esperma durante el proceso conocido como inducción espermática, mediante el cual transfieren el esperma desde la apertura genital hasta los órganos copuladores (Foelix 2011). Primero construyen una tela suspendida horizontalmente, moviéndose de arriba a abajo en repetidas ocasiones hasta que en una pequeña área de tela reforzada depositan una gota de esperma (para más detalle ver Costa & Pérez-

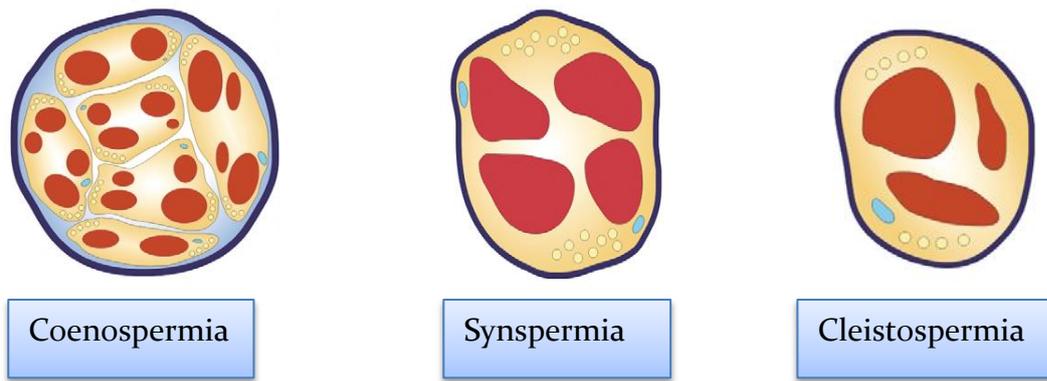
Miles 2002). El esperma probablemente es succionado hacia el ducto espermático cuando el fluido que lo llena se traslada fuera a través de las paredes rígidas, como así también posiblemente la eyaculación es efectuada por el mecanismo inverso, es decir por fluidos moviéndose hacia el lumen del ducto espermático a través de sus paredes (Eberhard & Huber 2010)

Las hembras de las arañas migalomorfas presentan la abertura genital en la zona ventral del abdomen entre los pares anteriores de los pulmones y se continúa con un par de receptáculos o espermatecas en forma de saco (Costa-Schmidt *et al.* 2017; Foelix 2011). Las espermatecas de hembras haplóginas o con estructuras simples tienen solo un ducto a través del cual el esperma ingresa y egresa, es decir el esperma recorre un solo camino durante la cópula y la oviposición (Eberhard & Huber 2010). Este tipo de espermatecas llamadas “*cul-de-sac*” asumen la ausencia de mezcla de esperma y que la prioridad espermática la tiene el último macho ya que su esperma sería el primero en salir y fertilizar los huevos (Austad 1984). Aunque Uhl (2000) sugiere que la información sobre morfología y uso de esperma mostró que los patrones de procedencia de esperma no se pueden predecir por medio del número de ductos conectados a la espermateca. Además el embolo del macho podría llegar al lumen de la espermateca permitiendo un mezcla de esperma (Michalik *et al.* 2005; Uhl 2000).

En las arañas existen tres tipos de transferencia espermática: coenospermia (varias células de esperma rodeadas por una cápsula), synspermia (cierto número de células de esperma fusionadas al final de la espermatogénesis y rodeadas por una cápsula) y cleistospermia (células espermáticas individuales rodeadas de una cápsula) (Michalik & Lipke 2013) (Fig. 1). La coenospermia fue definida por Bertkau (1877) y la observamos en Mesothelae, en migalomorfas y en la familia Filistatidae (Alberti &

Weinmann, 1985; Alberti *et al.* 1986; Alberti 2000; Michalik *et al.* 2003), además ha sido reportada como una característica plesiomórfica (Michalik & Ramírez 2014). Las espermatogonias y espermatocitos se encuentran localizados en la periferia del testículo, las espermátidas se sitúan próximas al lumen y los espermatozoides están en el lumen del testículo (Michalik & Ramírez 2014). En los conductos deferentes las células de espermia espiraladas se cubren con una secreción y en la parte distal de los ductos es donde la formación de la coenospermia se completa (Michalik & Ramírez 2014). En la mayoría de las arañas la producción de espermatozoides se continúa en la adultez (Michalik & Uhl 2005) lo que concuerda con el sistema de apareamiento polígamo de la mayoría de las arañas (Schneider & Andrade 2011). La cubierta de la célula espermática la protege durante el proceso de inducción, durante la transferencia espermática o en los órganos de almacenaje de las hembras; alternativamente a esta postura es posible que la cubierta evolucionó bajo selección sexual post-copulatoria (Michalik & Ramírez 2014).

Por su parte, las hembras poseen glándulas asociadas a las espermatecas que producen secreciones que organizan a los espermatozoides y pueden funcionar como una matriz para los mismos (Michalik *et al.* 2005; Uhl 2000). Las cápsulas con espermatozoides tienen que perder su cubierta en el tracto femenino antes del desenrollado de los mismos, proceso que estaría controlado por la hembra a través de la producción, en diferentes momentos, de varios productos glandulares, generando posiblemente una cascada de señalización (Herberstein *et al.* 2011b).



- Citoplasma    ● Complejo acrosomal    ● Cápsula de secreción
- Núcleo    ● Axonema    ● Secreción dentro la coenospermia

Figura 1. Representación de las diferentes formas de transferencia de esperma dentro de las arañas. Extraído de Michalik & Ramírez (2014).

En los últimos años numerosos trabajos en diferentes grupos de animales y en arañas han aportado valiosa información sobre los procesos que ocurren durante la cópula y como la selección sexual los moldea (Birkhead & Møller 1998; Clutton-Brock 2007; Costa-Schmidt *et al.* 2017; Eberhard & Huber 1998; Macedo & Machado 2014). En las arañas los sistemas reproductivos masculinos y femeninos son muy diversos y con gran potencial filogenético. En la actualidad, la combinación de estudios comportamentales unidos a investigaciones morfológicas son cruciales para el desarrollo del entendimiento de la selección sexual pre y post-cópula. Conjuntamente durante el estudio de las estrategias que cada individuo posee durante el apareamiento que los llevarán a un éxito reproductivo diferencial, es necesario comprender los procesos involucrados en la transferencia y almacenamiento de esperma. Las arañas migalomorfas acumulan información filogenética clave dada su ubicación como grupo hermano de Araneomorphae. Por lo tanto, a causa de la escasa información que existe

en este grupo, el estudio de éste constituye un punto inicial para formular hipótesis evolutivas de comportamiento que pueden ayudar en la comprensión de la evolución de patrones más complejos. *Acanthogonatus centralis* Goloboff 1995 es una araña migalomorfa perteneciente a la familia Nemesiidae, durante su periodo reproductivo tanto machos como hembras se aparean en repetidas ocasiones, el macho es el sexo móvil y cortejante; además despliegan encuentros rápidos, sin agresiones y con cópulas de corta duración (Ferretti *et al.* 2011).

Por todo lo expuesto el estudio de transferencia y almacenamiento de esperma en una especie de araña migalomorfa aportaría información valiosa para futuros estudios comparativos y evolutivos. Además podríamos predecir que la duración de la cópula o el número de inserciones se correlacionan positivamente con la cantidad de esperma transmitida por el macho. Así como también una posible elección por parte de la hembra a ciertas características morfológicas, del cortejo o de la cópula del macho relacionado con un mayor almacenamiento de esperma.

## 2. Objetivos

- 2.1. Cuantificar el número de espermatozoides presente en los bulbos de los machos y en las espermatecas de las hembras luego de copular así como la cantidad de espermatozoides contenidos en los bulbos de machos que no copularon.
- 2.2. Determinar si la cantidad total de esperma transferido se asocia significativamente con la duración de la cópula en hembras vírgenes.
- 2.3. Evaluar si unidades de comportamiento del cortejo que los machos realizan, así como el tamaño y peso de machos y hembras, influyen sobre la cantidad de esperma almacenado en la hembra.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. *Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio*

Se colectaron juveniles de *Acanthogonatus centralis* en Sierra de la Ventana (38°4'20,40'' S, 62°3'8,12'' O) durante los inviernos del 2013, 2014 y 2015. Se mantuvieron en el laboratorio en cajas de Petri con una delgada capa de tierra como sustrato y un algodón humedecido con agua como bebedero. Se alimentaron una vez a la semana con ninfas y adultos de cucarachas (*Blatella germanica* (Blattodea)) y grillos (*Acheta domestica* (Orthoptera)). Se controló las exuvias luego de cada muda para observar la presencia o ausencia de espermatecas, de esta forma se identificó a las hembras como vírgenes. Los machos se identificaron por la presencia de bulbos en sus palpos y espinas tibiales en patas I.

#### 3.2. *Criterios generales de las experiencias*

Las interacciones se grabaron usando una cámara digital Sony DCR-SR85 HD. Las cópulas se realizaron en un terrario de vidrio circular de 30 cm diámetro x 15 de alto con una cavidad central donde en cada interacción se colocaba una nueva hembra en su propia caja de Petri. Los apareamientos de *A. centralis* analizados para este capítulo siguieron los patrones descritos para esta especie (Ver capítulo 1). Luego de terminada la cópula, machos y hembras se sacrificaron mediante frío (-20 grados) y se conservaron en estas condiciones por un período de tiempo que no superó los dos días, para luego realizar la cuantificación de espermatozoides (Gabel & Uhl 2013). Los videos se analizaron en computadora usando el programa de análisis JWatcher 0.9 (Blumstein 2000). Se tomaron datos del tamaño de los individuos midiendo el largo y ancho del cefalotórax y el peso se registró con una balanza digital (Pioneer PA114 Sr 1-02; Ohaus

Corp., Pine Brook, NJ, USA). Las interacciones fueron realizadas en el laboratorio bajo luz natural, temperatura promedio de  $20,4^{\circ}\text{C} \pm 0,19$  y humedad relativa del 35 %.

### 3.3. *Cuantificación de esperma*

Se estimó el número de cápsulas y de espermatozoides sueltos en machos y hembras vírgenes de *A. centralis* luego de una cópula. Para los machos se estimó el número de espermatozoides en cada bulbo espermático, mientras que para las hembras se estimó el número de espermatozoides en ambas espermatecas.

#### 3.3.1. *Preparación de la soluciones para conteo de esperma*

Para la cuantificación de esperma, se utilizó la técnica de conteo de espermatozoides de Albo y Peretti (2015) adaptada para nuestro modelo de estudio. Primero se preparó la “solución salina de arañas” (Juusola & French 1998), para ello se colocó en 250 ml de agua destilada las siguientes sales: 3,26 g de Cloruro de sodio; 0,13 g de Cloruro de potasio; 0,30 g de Cloruro anhidro de calcio; 0,26 g de Cloruro de magnesio. A 10 ml de la solución salina de arañas se agregó 10  $\mu\text{l}$  de detergente celular “Triton X” para obtener la llamada “solución A”. Luego a 10 ml de solución salina de arañas se añadió 150  $\mu\text{l}$  de “solución A” para obtener la “solución B”.

#### 3.3.2. *Disección de ejemplares y conteo de espermatozoides*

En los machos se aislaron ambos bulbos espermáticos del resto del pedipalpo y de las hembras se extrajo las espermatecas bajo una lupa de disección Nikon SMZ 1500. Se colocó cada bulbo por separado y la espermateca entera en un tubo de microcentrífuga con 75  $\mu\text{l}$  de “solución B” y se trituró utilizando una pinza de punta fina para liberar el contenido espermático, sin comprometer la integridad estructural

de los espermatozoides. La muestra se sometió a 30 segundos de vortex y 10 minutos de centrifugado a 4000 Rpm. Este ciclo se repitió tres veces. Por último, la muestra fue sometida a 30 segundos más de vortex. Para el conteo de espermatozoides se tomó una alícuota (10 µl) de la muestra y se colocó en una cámara de conteo de hematocitos o cámara de Neubauer (Boeco) para su conteo bajo un microscopio de contraste de fase (Nikon eclipse 50i). El número de espermatozoides se contó en los 16 cuadros de las cuatro esquinas de la cámara y el número final se calculó basándose en el volumen total mediante la siguiente ecuación:  $N^{\circ} \text{ total de espermatozoides} = (75 \mu\text{l} * N^{\circ} \text{ espermatozoides contados}) / 0,4 \mu\text{l}$ .

### 3.3.3. Número de espermatozoides por cápsula

Durante la preparación de las muestras de hembras como de machos, en algunos casos se observó la ruptura de cápsulas con la consiguiente liberación de espermatozoides a la muestra (Fig. 2). Para una estandarización de los datos de conteo, se tomó con base en la bibliografía, un número de veinte espermatozoides por cápsula (Archibald *et al.* 2014; Michalik *et al.* 2004).

### 3.3.4. Criterio para la virginidad de las hembras

Para asegurar la virginidad de las hembras se realizó el conteo de espermatozoides de diez hembras colectadas a campo y mudadas en el laboratorio (“vírgenes”). Todas construyeron ooteca luego de ser colectadas, con lo cual se aseguró que todas habían copulado durante el período reproductivo previo. Luego de la dispersión de los juveniles las hembras mudaron convirtiéndose nuevamente en “vírgenes”. Se

sacrificaron y se procedió a la disección de las espermatecas para su posterior conteo de espermatozoides siguiendo el procedimiento explicado en el punto 3.3.2.

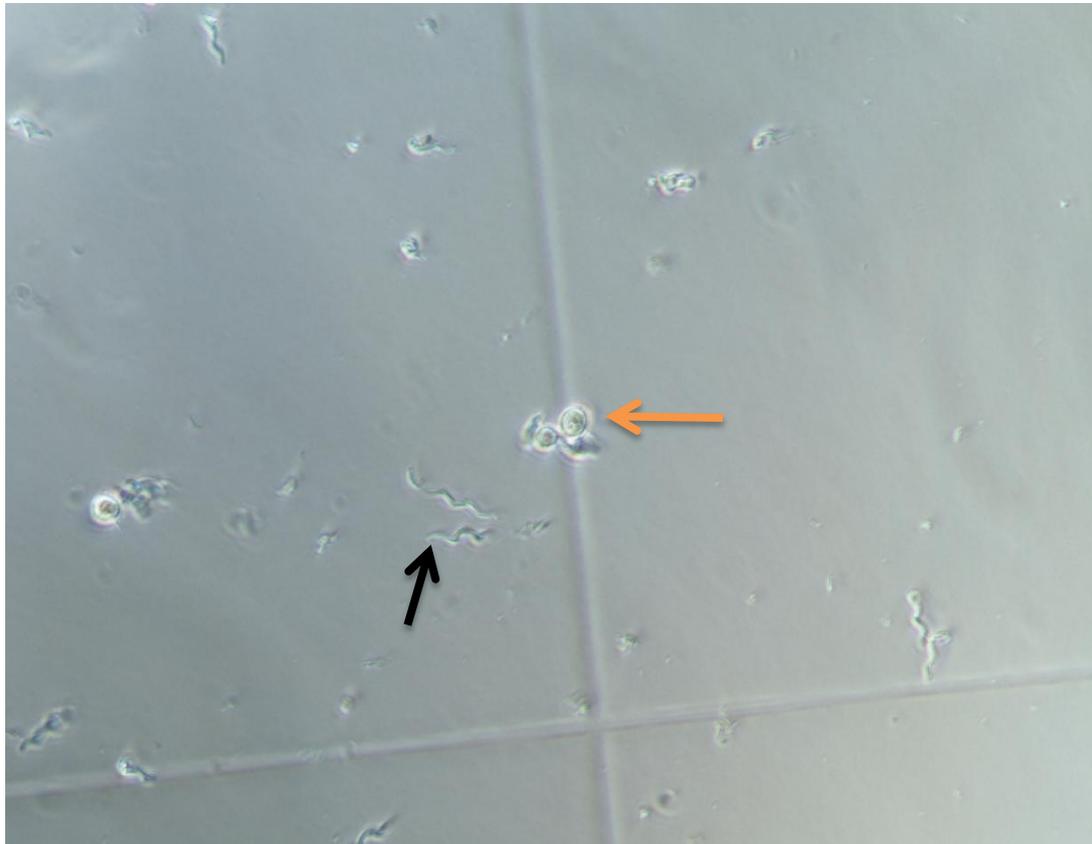


Figura 2. Foto tomada bajo microscópico donde se observan cápsulas de espermatozoides (flecha naranja) y espermatozoides sueltos (flecha negra) durante el conteo del eyaculado de un bulbo de un macho de *A. centralis*.

#### 3.4. *Diseño de los experimentos*

##### 3.4.1. *Cuantificación general del número de espermatozoides*

Se estimó el número de espermatozoides almacenados en las espermatecas de las hembras luego de copular ( $n=30$ ), y se estimó el número de espermatozoides remanente en los bulbos espermáticos de los machos después de copular ( $N=30$ ). Finalmente se cuantificó el número de espermatozoides que contienen ambos bulbos espermáticos de machos que no copulan (machos control,  $n=11$ ), a los fines de

comparar con el remanente de los machos con una cópula y obtener un valor en porcentaje indicador de la cantidad de esperma transferido en promedio. Además de los valores máximos y mínimos de espermatozoides que los machos transfieren y el remanente en sus bulbos.

#### 3.4.2. Duración de cópula y cuantificación del esperma

Para determinar si la duración total de la cópula influye en la cantidad de esperma que se transfiere, se asociaron dichas duraciones con el número de espermatozoides almacenados en las espermatecas de las hembras y en los bulbos espermáticos de los machos luego de cópulas (N=30).

#### 3.4.3. Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma

Para poder establecer si el cortejo del macho, su tamaño y peso está relacionado con la cantidad de espermatozoides almacenado en las espermatecas de las hembras y en los bulbos espermáticos de los machos luego de cópulas se realizaron correlaciones entre diferentes parámetros. Las variables comportamentales en la transferencia espermática se clasificaron en variables absolutas y variables relativas, las cuales se relativizaron con la duración total de las cópulas.

#### 3.5. Análisis estadísticos

Se aplicaron análisis de regresión simple para la estimación de la cantidad de esperma transferido y las duraciones de las cópulas. Para el análisis de estos resultados se utilizó el paquete estadístico PAST v.3.02 (Hammer *et al.* 2001). Para el análisis de la relación del número de espermatozoides con las restantes variables se utilizó el

modelo lineal generalizado mixto (GLMM), donde se tomó como variable respuesta al número de espermatozoides en machos y hembras y como variables explicativas se empleó la condición corporal de los individuos (peso, largo total de cuerpo, ancho y largo de cefalotórax), el cortejo de los machos (tiempo, número de unidades comportamentales) y los datos de la cópula (duración, número y duración de las inserciones, duración de catalepsis). Como factor aleatorio se utilizó la identidad (número) de los individuos. En el modelado de los datos se tuvo en cuenta una distribución binomial negativa. Para determinar la bondad de ajuste del modelo se valoraron los criterios de selección de modelos Akaike (AIC). Se utilizó el paquete glmmADMB (Automatic Differentiation-Model Builder) y el software estadístico RStudio Versión 1.1.383 (RStudio Team 2015).

#### 4. Resultados

##### 4.1. *Cópulas*

Durante las 30 cópulas observadas 29 machos comenzaron el cortejo luego del contacto con tela. El tiempo promedio de latencia de inicio de cortejo fue de  $99,90 \pm 108,04$  segundos. Todos los machos cortejaron a la hembra ya en contacto y previo a las inserciones. El tiempo promedio de cortejo previo al contacto fue de  $274,40 \pm 288,34$  y el tiempo de cortejo en contacto fue de  $105,69 \pm 48,09$  segundos. Datos de unidades de cortejo se muestran en la tabla 1. Las hembras salieron de su tubo de seda y se acercaron a los machos cortejantes en un 60 % de veces, adoptaron posición de cópula (espinas tibiales de los machos enganchadas en los laterales de los quelíceros de las hembras). La duración media de la cópula fue de  $76,34 \pm 59,89$  segundos con un promedio de inserciones por cópula de  $10,61 \pm 5,72$  las cuales duraron en promedio  $3,84 \pm 1,32$  segundos. En un 63,3 % de las veces las hembras comenzaron a mover sus quelíceros para que el macho desenganche sus patas I y finalice la cópula. No se registró ningún caso de canibalismo posterior a la cópula, aunque una hembras persiguió al macho luego de finalizado el encuentro sin dañarlo físicamente. En el 63,3 % de los casos luego de la cópula la hembra permaneció inmóvil en catalepsis durante  $23,66 \pm 36,66$  segundos.

##### 4.2. *Cuantificación general del número de espermatozoides*

Al comparar los machos con una cópula con los machos control se obtuvo que los machos transfirieron aproximadamente el 18.8 % de su esperma en una cópula, mientras que las hembras almacenaron el 97.4 % del total de esperma transferido. En tanto, la cantidad remanente en los bulbos representó el 81,2 % (Tabla 2 Fig. 3).

Tabla 1. Unidades de cortejo de los machos de *A. centralis* durante los encuentros con hembras vírgenes.

	CORTEJO PREVIO AL CONTACTO					CORTEJO EN CONTACTO			
	rasgar	tirones	contracciones	repiqueteo	espasmos	masaje	golpes	sacudidas	
Media	11,17	1,20	7,10	17,93	1,27	437,13	138,10	6,07	
DE	15,01	3,58	11,32	41,38	3,89	214,21	93,48	3,40	

Tabla 2. Número medio, desvío estándar, máximo y mínimo de espermatozoides contabilizados en machos y hembras luego de una cópula y en los grupos control (sin copular).

	HEMBRAS (N=30)	MACHOS (N=30)	MACHOS CONTROL (N=11)	HEMBRAS CONTROL (N=10)
Promedio n° de espermatozoides	194187,50	859231,25	1058642,05	0
Máximo	2017500	3382500	2138062,5	0
Mínimo	0	195187,5	390375	0
Desvío Estándar	382280,10	674948,90	620428,77	0

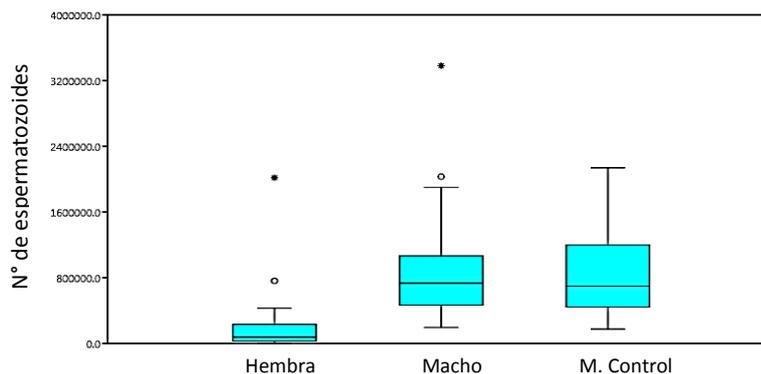


Figura 3. Número de espermatozoides contabilizados en las espermatecas de las hembras y en los bulbos de los machos de *A. centralis* después de una cópula y en machos sin copular (control).

### 4.3. Duración de cópula y cuantificación del esperma

Las regresiones lineales no encontraron relación entre la duración de la cópula con la cantidad de esperma almacenado por la hembra ( $R^2=0,22$ ;  $f=0,632$ ;  $p=0,433$ ) así como tampoco con el remanente en los bulbos de los machos ( $R^2=0,01$ ;  $f=0,034$ ;  $p=0,854$ ) (Fig. 4 a y b).

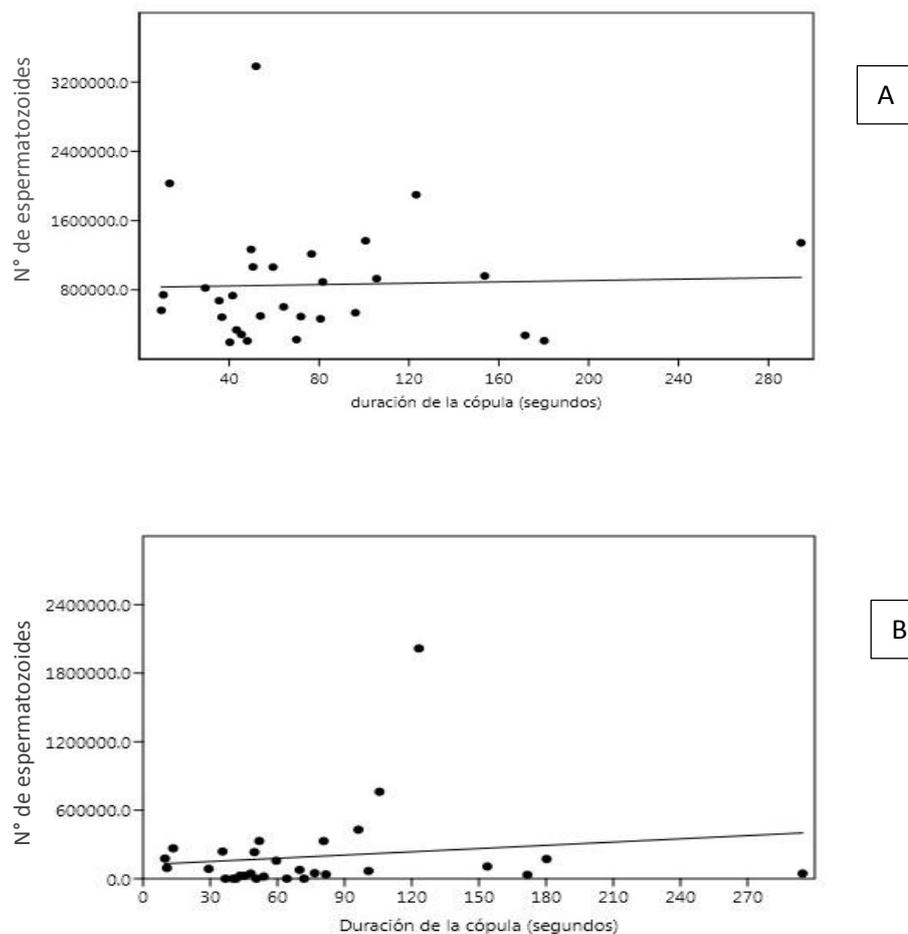


Figura 3. Gráfico de la regresión lineal entre la duración de la cópula y la cantidad de esperma en los bulbos de los machos (A) y las espermatecas de las hembras (B) luego de una cópula.

#### 4.4. Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma

Al analizar bajo un modelo lineal generalizado mixto la cantidad de espermatozoides restantes en los bulbos de los machos luego de una cópula con variables morfológicas y comportamentales, hallamos que el número de inserciones durante la cópula y del comportamiento “golpes” presentan una relación negativa con la cantidad de espermatozoides mencionada, siendo positiva con el número de espermatozoides almacenados en la espermateca de la hembra (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del GLMM donde se relaciona la cantidad de esperma remanente en el bulbo de los machos con variables explicativas comportamentales. Mejor modelo predictivo basado en una preselección usando AIC.

Variables Explicativas	Estimativo	Error Estándar	Estadístico z	Valor p
Tiempo de Cópula	4.99e-03	3.18e-03	1.57	0.1164
Nº de Inserciones	-8.03e-02	3.02e-02	-2.66	0.0078 **
Latencia	1.76e-04	1.42e-03	0.12	0.9012
Cortejo Antes de Contacto	-7.57e-04	7.80e-04	-0.97	0.3316
Cortejo en contacto	6.22e-03	5.37e-03	1.16	0.2471
Catalepsis	-2.19e-04	3.27e-03	-0.07	0.9466
Nº Rasgar	2.86e-03	1.54e-02	0.19	0.8530
Nº Tirones	4.89e-02	4.16e-02	1.18	0.2389
Nº repiqueteo	-1.20e-02	2.37e-02	-0.51	0.6135
Nº contracción	1.20e-02	7.19e-03	1.68	0.0939
Nº espasmos	-2.11e-02	2.78e-02	-0.76	0.4487
Nº Masajes	2.18e-03	2.17e-03	1.00	0.3158
Nº Sacudidas	1.97e-04	5.61e-02	0.00	0.9972
Nº Golpes	-2.48e-03	1.21e-03	-2.05	0.0408 *
Esperma en espermateca	6.32e-07	2.79e-07	2.27	0.0235 *

Cuando relacionamos la cantidad de espermatozoides almacenados en las espermatecas de las hembras, encontramos que guardan relación positiva con el largo del cefalotórax del macho y el largo total de la hembra y presentan un efecto negativo sobre el peso y largo de cefalotórax de la hembra (Tabla 4). Además se observó que el comportamiento previo al contacto “espasmos” se relaciona negativamente pero el número de “sacudidas” lo hace positivamente (Tabla 4).

Al analizar los datos comportamentales aislados tanto el número de espermatozoides de los machos como el número de masajes se relacionan con lo almacenado. Por último el tiempo de catalepsis presenta una relación negativa con la cantidad de esperma almacenado por la hembra (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del GLMM donde se relaciona la cantidad de esperma almacenado en las espermatecas de las hembras con variables explicativas comportamentales. Mejor modelo predictivo basado en una preselección usando AIC.

Variables Explicativas	Estimativo	Error Estándar	Estadístico z	Valor p
Tiempo de Cópula	2.81e-02	2.93e-02	0.96	0.3367
Nº de Inserciones	-3.72e-01	2.90e-01	-1.28	0.1995
Latencia	6.59e-03	1.28e-02	0.51	0.6072
Cortejo antes de Contacto	3.26e-03	6.80e-03	0.48	0.6314
Cortejo en contacto	-4.04e-02	4.78e-02	-0.85	0.3979
Catalepsis	-8.55e-02	3.28e-02	-2.61	0.0091 **
Nº Rasgar	1.85e-01	1.29e-01	1.43	0.1535
Nº Tirones	-1.43e-01	3.80e-01	-0.38	0.7074
Nº repiqueteo	3.08e-02	2.10e-01	0.15	0.8831
Nº contracción	5.29e-03	6.93e-02	0.08	0.9392
Nº espasmos	-3.40e-01	2.74e-01	-1.24	0.2152
Nº Masajes	4.27e-02	2.06e-02	2.07	0.0385 *
Nº Sacudidas	4.32e-01	5.27e-01	0.82	0.4124
Nº Golpes	-1.51e-03	1.10e-02	-0.14	0.8912
Espermatozoides en bulbos	3.78e-06	1.89e-06	2.00	0.0453*

Tabla 4. Resultados del GLMM donde se relaciona la cantidad de esperma almacenado en las espermotecas de las hembras con variables explicativas comportamentales y morfológicas. Mejor modelo predictivo basado en una preselección usando AIC.

VARIABLES EXPLICATIVAS	ESTIMATIVO	ERROR ESTÁNDAR	ESTADÍSTICO Z	VALOR P
Peso ♂	5.81e+01	3.42e+01	1.70	0.0897
Largo Cefalotórax ♂	1.03e+01	4.20e+00	2.45	0.0144*
Ancho Cefalotórax ♂	3.09e-01	4.50e+00	0.07	0.9453
Largo Total ♂	-3.58e+00	1.88e+00	-1.91	0.0565
Peso ♀	-7.49e+01	2.61e+01	-2.87	0.0041**
Largo Cefalotórax ♀	-8.12e+00	2.64e+00	-3.08	0.0021**
Ancho Cefalotórax ♀	-7.46e+00	3.86e+00	-1.93	0.0531
Largo Total ♀	9.43e+00	2.93e+00	3.22	0.0013**
Tiempo de Cópula	-4.13e-02	2.88e-02	-1.44	0.1509
Nº de Inserciones	-1.04e+00	3.54e-01	-2.95	0.0032**
Latencia	2.36e-02	1.43e-02	1.65	0.0985
Cortejo Antes de Contacto	1.15e-02	6.09e-03	1.89	0.0584
Cortejo en contacto	8.72e-02	6.80e-02	1.28	0.1996
Catalepsis	-9.52e-02	6.74e-02	-1.41	0.1581
Nº Rasgar	3.76e-02	1.23e-01	0.30	0.7605
Nº Tirones	1.81e-01	3.42e-01	0.53	0.5960
Nº repiqueteo	-2.98e-01	1.99e-01	-1.50	0.1344
Nº contracción	7.15e-02	6.24e-02	1.15	0.2518
Nº espasmos	-5.25e-01	2.61e-01	-2.01	0.0442*
Nº Masajes	-6.00e-03	2.12e-02	-0.28	0.7776
Nº Sacudidas	1.93e+00	6.35e-01	3.04	0.0023**
Nº Golpes	-2.02e-02	1.52e-02	-1.33	0.1823
Espermatozoides en bulbos	2.97e-06	1.78e-06	1.67	0.0954

## 5. Discusión

### 5.1. *Duración de cópula y cuantificación del esperma*

En el presente estudio se pudo observar que luego de una sola cópula los machos de *A. centralis* transfieren un bajo porcentaje del esperma presente en sus bulbos. Una de las posibles razones para este resultado puede ser el alto costo y el riesgo que los machos tienen al realizar una nueva recarga de sus bulbos (Costa & Pérez-Miles 2002). Por otro lado los machos podrían estar optando por realizar pequeñas eyaculaciones en cada cópula para poder copular rápidamente con nuevas parejas sin realizar inmediatamente una nueva inducción espermática y así maximizar sus chances de éxito reproductivo (Elgar 1995). Las hembras poseen espermatecas “*cul-de-sac*”, siendo posible la existencia de “prioridad al último macho”, por lo que aumentar el número de cópulas sería la forma directa de aumentar la paternidad (Uhl 2000). Esto concuerda con la estrategia reproductiva de la mayoría de las arañas migalomorfas estudiadas hasta el momento que consiste en que machos y hembras copulan con la mayor cantidad de parejas posibles durante el periodo reproductivo (Costa-Schmidt *et al.* 2017). Por el contrario, porcentajes mayores de transferencia espermática durante una cópula se observaron para arañas enteleginas, con espermatecas “*cunduit*” y prioridad primer macho (Anderson & Hebets 2017; Bukowski *et al.* 2001; Snow & Andrade 2004). Durante las experiencias luego de cópulas con inserciones exitosas se observó que en el 20% de los casos el macho de *A. centralis* no transfirió eyaculado en la espermateca o las hembras no almacenaron esperma, un igual resultado se encontró en *Argiope aurantia* (Araneidae) sin poder llegar a una conclusión de este evento fallido (Assis & Foellmer 2016).

Las cópulas son relativamente de corta duración, lo que puede deberse a que cópulas cortas se vean beneficiadas cuando los costos asociados a ellas incrementan con la duración (Ceballos *et al.* 2015). Las cópulas prolongadas pueden ser energéticamente costosas, ya que puede aumentar el riesgo de depredación, la probabilidad de interrupción antes que la transferencia de esperma haya terminado y la transmisión de enfermedades además de disminuir el tiempo que podría destinarse a otras actividades (alimentación, oviposición, comportamiento de cuidado, etc.) (Andrés & Cordero Rivera 2000). El periodo reproductivo de *A. centralis* es a finales de otoño, invierno y principio de primavera, donde la cantidad de artrópodos disminuye, por lo que extensos momentos fuera de sus refugios los convierte en presas, debido a esto que sus cópulas sean de corta duración puede traducirse para las hembras a escaso tiempo fuera del refugio (Elgar 1995). Al mismo tiempo se considera que parejas con estructuras sexuales simples favorecerían a cópulas más cortas, para aumentar sus chances reproductivas con otras parejas, a diferencia de las arañas enteleginas (Elgar 1995).

Asimismo en nuestro estudio, se pudo constatar que la duración de la cópula no se relacionó con la cantidad de esperma que almacena la hembra o remanente en los bulbos de los machos. Si la duración de las cópulas está positivamente relacionada con la transferencia de esperma, los machos que copulan por períodos de tiempo más prologados transferirán más esperma y, en consecuencia dominarán numéricamente en la competencia por la fecundación (Herberstein *et al.* 2011a; Kaster & Jakob 1997; Simmons 2001). Existen varios ejemplos donde se observó esta relación como en el caso de la araña *Paratrechalea ornata* (Trechaleidae) (Albo & Peretti 2015) y *A. aurantia* (Assis & Foellmer 2016), donde al aumentar el tiempo de la cópula aumenta a

la vez el número de esperma en las espermatecas de las hembras. Además se encontró una correlación entre la duración con el éxito en la fertilización y número de descendencia debido a la cantidad de esperma transferido (Albo, Bilde, & Uhl, 2013). La cantidad de esperma transferido y almacenado podría depender de otros factores y no ser lineal con la duración de la cópula, como lo observado en este trabajo. Snow y Andrade (2004) encontraron que los machos de *Latrodectus hasselti* (Theridiidae) transfieren la mayor cantidad de esperma dentro de los primeros cinco minutos, los autores concluyen que el responsable de esto sería el canibalismo hacia los machos y no así la duración de la cópula. Diferente resultado tiene la araña con canibalismo *Argiope keyserlingi* (Araneidae) donde sólo cuando el macho es canibalizado, el esperma almacenado aumenta con la duración de la cópula (Herberstein *et al.* 2011a). Anderson y Hebets (2017) hallaron que en *Pisaurina mira* (Pisauridae) el número de inserciones determina la cantidad de esperma transferido pero no el tiempo de esas inserciones. No se encontró relación con el esperma almacenado y transmitido en la araña *Nephila clavipes* (Araneidae), donde con una sola intromisión del bulbo se transmite todo el esperma pero las cópulas son más largas, sugiriendo así la posible existencia de tapones genitales (Linn *et al.* 2007).

Es importante mencionar que todos los casos citados anteriormente son en arañas con Cleistospermia y los resultados presentados en este capítulo son los primeros en arañas con coenospermia. Herberstein *et al.* (2011b) esperaba que en ambos tipos de empaquetamiento de esperma, existan diferencias en la relación de la duración de la cópula con la tasa de transferencia de esperma. Estos autores asumen que los paquetes con esperma requieren ductos de grandes diámetros y que la velocidad de transferencia podría llegar a su límite rápidamente si son pequeños, por

lo que sugiere que si existe un conflicto sexual sobre la duración de la cópula se esperaría ver diferentes adaptaciones morfológicas y comportamentales para controlar la duración de la cópula (Herberstein *et al.* 2011b).

### *5.2. Relación de variables comportamentales con la cantidad de esperma*

Si bien en nuestro estudio no se encontró una relación con la duración de la cópula si se encontraron variables morfológicas y comportamentales que tienen un efecto en la capacidad de almacenamiento de la hembra y de transferencia del macho.

El número de esperma en los bulbos de los machos luego de una cópula se relacionó negativamente con el número de inserciones. Teniendo en cuenta que luego de cada inserción los bulbos verían disminuida su cantidad de esperma, este resultado confirmaría que a más inserciones menor esperma quedaría así en los bulbos. Lo que también sugiere esta disminución es que cada inserción transmitiría una misma o similar cantidad de esperma. Anderson y Hebets (2017) encontraron en *Pisaurina mira* (Pisauridae) que por cada inserción, los machos transfieren la misma cantidad de esperma a la hembra, alcanzando rápidamente la transferencia total del eyaculado. Si se asume esta proporción, pero la duración de la cópula como ya se vio no se relaciona con la cantidad de esperma, se podría esperar que más cosas estén sucediendo durante ese momento que crean una transferencia diferencial y almacenamiento de esperma. En ciertos casos, el aumento de la transferencia espermática no necesariamente refleja la cantidad de esperma almacenado y disponible para la fertilización debido a que algunas hembras pueden manipular el almacenamiento de esperma (Eberhard 1996; Herberstein *et al.* 2011a). Así como también los machos pueden provocar altas tasas de

paternidad si transfieren en el eyaculado otras sustancias importantes en la competencia post-copulatoria (Birkhead & Møller 1998).

El número de espermatozoides en los bulbos en *A. centralis* luego de una cópula mostró una relación positiva en el almacenamiento en la espermateca. Si todos los machos transfirieron una proporción similar de su espermatozoides, machos con más espermatozoides en sus bulbos entregaron una cantidad final mayor y consecuentemente en sus bulbos conservaron una gran cantidad de espermatozoides. Existe una gran variabilidad en el conteo de espermatozoides en los machos dentro de la misma especie en diferentes familias de arañas que concuerda con estos datos (Albo *et al.* 2013; Assis & Foellmer 2016; Herberstein *et al.* 2011a; Snow & Andrade 2004).

Por otra parte, los machos de *A. centralis* que realizaron mayor cantidad de “golpes” en el esternón y abdomen de la hembra presentaron menor cantidad de espermatozoides remanente en sus bulbos luego de una cópula. Quizás esto implique que una mayor estimulación del área genital de la hembra le permitiría al macho transferir una mayor proporción de su espermatozoides, aunque esta unidad comportamental no influyó en el almacenamiento realizado por la hembra. Por lo tanto se podría decir que es una conducta que favorece al macho, pero que no es tomada por la hembra como una señal. Estos rápidos movimientos podrían ayudar a optimizar el eyaculado.

Con respecto al número de espermatozoides que las hembras almacenaron, se comprobó la relación positiva con el largo del cefalotórax del macho. En general, en varios invertebrados terrestres, machos más grandes producen más descendencia que machos más pequeños o el tamaño del macho puede explicar la variación en paternidad (Archer & Elgar 1999; Parker 1970; Sato *et al.* 2017; Wiernasz *et al.* 2001). En arañas esta misma relación positiva fue observada en *Micrathena gracilis* (Araneidae)

(Bukowski & Christenson 1997) y en *Nephila clavipes* (Araneidae) (Cohn 1990) aunque en este último caso fue el largo total del macho el relacionado con la cantidad de esperma almacenado por la hembra. Consecuentemente los machos grandes podrían llenar mejor la espermateca que machos pequeños, dejando menos volumen para otros machos y/o la hembra podría preferir almacenar y usar el esperma de machos grandes (Schneider *et al.* 2000). Aquí el tamaño del macho no mostró relación con el esperma remanente en sus bulbos.

Desde una perspectiva femenina, varias medidas morfológicas de las hembras se relacionan con lo que almacenan en sus espermatecas. Tanto el peso como el largo del cefalotórax se relacionan negativamente pero el largo total lo hace positivamente. De esta forma existen hembras de corta edad (cefalotórax pequeño), hembras con poco peso (corta edad o “delgadas”) y hembras largas (abdomen largo, por lo tanto sistema reproductivo) que almacenan mucho esperma. Hembras en su primer periodo reproductivo son más pequeñas y vírgenes absolutas, una posibilidad es que en este estado sean menos selectivas en la cantidad de esperma que almacenan y que las hembras con más experiencia estén seleccionando el esperma que almacenan (Eberhard 1996). Por otro lado la capacidad de los machos de modular la duración de la cópula en relación con el status reproductivo de las hembras es común en los arácnidos e insectos (Austad 1984; Andrés & Cordero Rivera 2000; Marcotte *et al.* 2005; Solensky & Oberhauser 2009). La correlación con el tamaño total, si se tiene en cuenta que el cefalotórax tiene relación negativa, debe estar dada por el tamaño del abdomen, por lo tanto, hembras más fecundas con órganos reproductivos más grandes almacenarían más esperma; quizás en función de la cantidad de huevos que tiene para fecundar (Huber 2005; Sato *et al.* 2017).

Las hembras en estudio además presentan un efecto negativo con respecto al número de inserciones, almacenando más esperma con pocas inserciones. Este resultado refuerza el hecho de que las hembras quizás poseen la capacidad de seleccionar la cantidad de esperma almacenado y que ésta no está controlada enteramente por el macho. En efecto, las hembras estarían modeladas por la selección sexual para utilizar estos estímulos del macho en el desencadenamiento de mecanismos que afectan al éxito reproductivo del macho (Eberhard 1996).

Con respecto al cortejo del macho, las hembras de *A. centralis* almacenaron más esperma cuando los machos realizaron “masajes” y “sacudidas”, ambos cortejos realizados ya en contacto, y menos cuando los machos realizan “espasmos” cortejo previo al contacto. También se observó que cuando las hembras aumentan su tiempo de catalepsis almacenan poco esperma.

Los cortejos que refuerzan el almacenado de esperma son previos a la cópula cuando la pareja está posicionándose para comenzar las inserciones. Estos no son comportamientos coercitivos, si no de posible estimulación hacia las hembras (Huber & Eberhard 1997). Los “masajes” (movimientos realizados con patas II y III del macho sobre la región dorsal y final del cefalotórax) y las “sacudidas” (movimientos repentinos del macho que posicionan a la hembra en el ángulo correcto de cópula) serían movimientos del macho que estimulan a la hembra para influenciar la decisión de fertilización de los huevos. En los últimos años varios estudios, desde la perspectiva de la elección críptica femenina, demostraron como cortejos realizados por el macho pueden llegar a provocar la utilización diferencial del esperma por parte de la hembra (Aisenberg & Eberhard 2009; Albo *et al.* 2013; Bleu *et al.* 2012; Calbacho-Rosa *et al.* 2013; Peretti & Eberhard 2010). Los “espasmos” (primer par de patas elevado, extendido

y oscilante en el aire) posiblemente tuvieron relación negativa por su baja ocurrencia durante los encuentros, pocos machos realizaron esta unidad por lo que el resultado podría deberse a falta de robustez en el análisis estadístico.

Por último, el momento de quietud final siempre se relacionó en migalomorfos con el escape del macho sin riesgo al canibalismo (Costa-Schmidt *et al.* 2017). Teniendo en cuenta que los casos de canibalismos son escasos (Ferretti *et al.* 2013a), la funcionalidad de la catalepsis no ha sido descrita. En el presente estudio se halló que las hembras de *A. centralis* almacenan más esperma cuando la catalepsis es más cortas o hay ausencia de ellas debido a una interrupción por su parte de la cópula. Por lo tanto podríamos sugerir que la hembra en estado de catalepsis indicaría al macho que ella acepta que la cópula continúe.

Sobre la base de lo expuesto se concluye que *A. centralis* es una araña con coenospermia, durante la cópula los machos transfieren solo una porción de la totalidad de esperma que poseen siendo posibles futuras cópulas sin inducción espermática y los riesgos asociados que ellas tienen. No se encontró relación en la duración de la cópula con la cantidad de esperma remanente en los bulbos de los machos ni almacenado en las espermatecas de las hembras. No obstante, numerosas relaciones se encontraron con la capacidad de almacenaje de esperma que presentan las hembras. Los resultados confirmarían un mayor control interno por parte de la hembra en la cantidad de esperma presente en sus espermatecas luego de una cópula, así como también una amplia comunicación de la pareja previa a la cópula y posterior a ella.

Capítulo IV

## Dimorfismo Sexual no Aparente

## 1. Introducción

Los machos como las hembras utilizan diferentes estrategias para alcanzar su máximo potencial reproductivo, así que las características del cuerpo que se relacionan con los cortejos, peleas entre machos, transferencia espermática y fecundidad suelen estar bajo fuerzas selectivas diferenciales entre los sexos (Clutton-Brock 2007; Eberhard 2009b).

El dimorfismo sexual es un fenómeno ampliamente distribuido en el reino animal, consistiendo en diferencias morfológicas, fisiológicas o comportamentales entre machos y hembras lo que resulta en distintas formas y tamaños entre los sexos (Andersson 1994; Hedrick & Temeles 1989). Las hembras producen huevos grandes y nutritivos mientras que los machos espermia móvil, esta anisogamia, es decir, gametas de dos tamaños, subyace la evolución de la diferencia entre sexos en comportamiento y morfología (Bonduriansky 2001; Parker 1970; Trivers 1972). Las asimetrías en la inversión gamética de machos y hembras genera diferencias en la inversión que cada uno asume durante el apareamiento y posterior a éste (Andersson 1994; Arnqvist & Rowe 2005). Cada sexo muestra características adaptativas de acuerdo a sus diferentes roles reproductivos, en general las hembras son más selectivas en tanto que los machos son el sexo móvil (ej.: que busca a las hembras). El dimorfismo sexual resulta de una correlación genética entre los sexos y presiones selectivas diferentes entre ellos, particularmente selección natural relacionada a roles sexuales, estilos de vida y selección sexual, relacionada a competición por parejas (Fairbairn *et al.* 2007; Hedrick & Temeles 1989; Lande 1980)

El dimorfismo sexual en el tamaño corporal (SSD “*sexual size dimorphism*”) de los individuos está ampliamente distribuido en el reino animal y estudiado desde

Darwin (1859, 1871), y continuado por numerosos autores (ej.: Fairbairn *et al.* 2007; Hedrick & Temeles 1989; Lande 1980). El rango en el tamaño corporal que existe de la mayoría de los animales al alcanzar la madurez sexual es un delicado balance entre selección por sobrevivir y selección por reproducirse y entre diferentes presiones y restricciones selectivas (Stillwell *et al.* 2010).

Una tendencia moderada hacia hembras más grandes es el patrón de dimorfismo sexual más común en animales y plantas angiospermas dioicas (Fairbairn 2007). Con casos extremos, donde el cuerpo del macho casi se redujo a estructuras dadoras de espermatozoides que viven permanentemente sobre o dentro de la hembra (ej.: gusanos marinos *Osedax*, (Rouse *et al.* 2004) o *Bonelia viridis* (Berec *et al.* 2005)). Pese a que las hembras de los mamíferos tienen una demanda energética mucho mayor que otros animales ya que presentan además gastos de la gestación y la lactancia, en promedio, son los machos el sexo más grande (machos 10% más grandes en un 45% de las especies (Lindénfors *et al.* 2007)). En los mamíferos la hipótesis más apoyada es que estas diferencias entre los sexos se producen por selección sexual a través de competición macho-macho por el acceso a las hembras (Lindénfors *et al.* 2007). Dentro de los anfibios el patrón común es una tendencia femenina de dimorfismo sexual en tamaño, principalmente en sapos y salamandras con pocos casos donde los machos son más grandes que las hembras (Kupfer 2007). En los insectos, un mayor tamaño de los individuos es favorecido por selección de fecundidad en hembras y selección sexual en machos (Fairbairn *et al.* 2007). Machos grandes pueden incrementar su éxito reproductivo por medio de la competencia macho-macho o elección femenina (Andersson 1994) o incrementar la fecundidad femenina a través de

regalos nupciales (Fox *et al.* 2006). Hembras grandes generalmente tienen mayor fecundidad y pueden producir mayor descendencia (Davidowitz 2008).

En las arañas, el tamaño de las hembras se encuentra más diversificado que el de los machos dentro y entre los grupos, siguiendo la línea de selección por fecundidad en la evolución del dimorfismo sexual del tamaño (Coddington *et al.* 1997; Head 1995). Las presiones selectivas actúan diferente en el cuerpo de la hembra y en el del macho produciendo patrones de crecimiento alométricos y creando dimorfismos sexuales (Fairbairn 2007). El dimorfismo sexual es muy evidente en muchas arañas tropicales del grupo de las tejedoras (como *Nephila*, *Gasteracantha* y *Micrathena*) (Foelix 2011).

Como ya vimos, los roles reproductivos difieren en la mayoría de los animales (Trivers 1972). Por lo tanto la asignación de recursos también debería ser diferente, con machos que maximizan la cantidad de recursos en tejidos involucrados en la búsqueda de pareja o la competencia macho-macho, y las hembras asignando recursos a tejidos relacionados con energía de almacenamiento o nutrientes necesarios para producir huevos (Moya-Laraño *et al.* 2008).

La condición corporal, definida como la cantidad relativa de energía reservada en el cuerpo de un animal, muestra una gran relación con varios componentes del éxito reproductivo de los individuos (Moya-Laraño *et al.* 2008). Así individuos en “buena condición” en términos de reserva de nutrientes pueden pasar mayores periodos sin alimentarse (Atkinson & Ramsay 1995), sobrevivir largos viajes migratorios (Merila & Svensson 1997), mantener un sistema inmune más competente (Møller & Saino 1994), tener alta fecundidad (Moya-Laraño 2002) y presentar mayor éxito reproductivo (Cotton *et al.* 2006). Debido a esto la condición corporal en

términos de almacenamiento de reservas puede ser considerada como una medición del estado sanitario y éxito reproductivo y las diferencias sexuales en la condición corporal puede explicarse como una acumulación de distintos tipos de nutrientes (Moya-Laraño *et al.* 2008).

Las distintas partes del cuerpo de las arañas se pueden relacionar diferencialmente con el fitness de la hembra y el macho. El abdomen de las arañas se relaciona con las actividades vegetativas, incluyendo la reproducción (Foelix 2011) y por medio de tener grandes abdómenes son capaces de aumentar la energía y la producción y almacenamiento de huevos. De esta forma la selección de fecundidad tiende a favorecer la evolución de grandes abdómenes en las hembras o un mayor largo total del cuerpo. Por el contrario, el cefalotórax se encuentra relacionado con la locomoción, ingesta de comida y las funciones nerviosas integrativas (Foelix 2011), relacionándose largos caparazones con incremento de movilidad e eficiencia trófica (Fernández-Montraveta & Cuadrado 2013).

En tarántulas machos y hembras parecen ser similares en tamaño (Hénaut *et al.* 2015). Luego de alcanzar la madurez sexual, machos y hembras difieren drásticamente en su estilo de vida, mientras las hembras son “*sit and wait*” predadores, permaneciendo largos periodos de tiempo en el mismo lugar, los machos se dispersan caminando grandes distancias en búsqueda de parejas (Costa & Pérez-Miles 2002; Shillington & Verrell 1997). Durante esos periodos los machos poseen tasas metabólicas en reposos más elevadas que las hembras, manteniendo un estilo de vida más costoso (Shillington 2005). En su búsqueda por pareja no se observan combates macho-macho, en cambio, la competencia de lucha se basa en la habilidad que presenta cada individuo para encontrar una hembra, rasgos tales como locomoción o

velocidad serán cualidades que influenciarán el éxito reproductivo (Stoltey & Shillington 2009). En consecuencia, rasgos morfológicos y órganos sensoriales adaptados en el macho en la búsqueda de pareja, serán favorecidos a través de selección sexual por la competencia de lucha (Foellmer & Moya-Laraño 2007).

Luego de una invasión de microorganismos, tanto organismos procariotas como eucariotas han desarrollado varios mecanismos para luchar contra la infección (Miranda *et al.* 2009). Una de las primeras barreras de defensa primaria son los péptidos antimicrobianos, componentes esenciales de la reacción de defensa en plantas, vertebrados e invertebrados. Otros mecanismos de defensa en artrópodos son la encapsulación, formación de nódulos y fagocitosis de microbios a través de hemocitos (Miranda *et al.* 2009). Durante la respuesta humoral, luego del reconocimiento del microorganismo invasor, un complejo proceso inicia la cascada, 1) induce la coagulación, 2) luego la melanización y 3) se liberan péptidos antimicrobianos (Kuhn-Nentwig & Nentwig 2013). Cuando la cápsula se comienza a formar se cubre por pigmento negro, la melanina, la cual es resultado de un cascada de fenoloxidasa (PPO) y el organismo bajo la cápsula pasa por proceso de asfixia, intoxicación por quinonas e hidroquinonas vía la cascada de PPO, encuentro con péptidos antimicrobianos y con intermediarios del reacción del nitrógeno y el oxígeno (Ahtiainen *et al.* 2005). Después de varias horas de infección, el intruso está cubierto de capas de melanina y muere (Gillespie and *et al.* 1997; Krams *et al.* 2016)

La encapsulación melánica en las arañas es una importante respuesta del sistema inmune frente a nematodos y parásitos (Gillespie and *et al.* 1997). Sin embargo, el hospedador sufre costos energéticos como resultado del trade-off entre las

inversiones que realiza durante su vida y los costos de la respuesta inmune, reflejándose en la calidad de los machos y las hembras ante la reproducción (Ahtiainen *et al.* 2005; Rantala *et al.* 2002, 2003). Dimorfismo sexual en respuesta inmune en arañas fue observado en *Physocyclus dugesi* (Pholcidae); *Aglaoctenus lagotis* y *Allocosa brasiliensis* (Lycosidae), mostrando un trade off entre la habilidad inmune y costos de reproducción, interacciones agresivas y construcción de telas (Aisenberg & Peretti 2011; Calbacho-Rosa *et al.* 2012; Gonzalez *et al.* 2015).

En el marco de evaluar la existencia de dimorfismos sexuales a nivel morfológico, estructural e inmunológico se utilizó, en diferente grado, a las tarántulas *Grammostola vachoni*, *Plesiopelma longisternale* y a la nemésida *Acanthogonatus centralis* para brindar información de tales parámetros dentro del grupo de las migalomorfas.

## 2. Objetivos

- 2.1. Evaluar el grado de dimorfismo sexual con respecto al peso y tamaño de corporal en tres especies *Grammostola vachoni*, *Plesiopelma longisternale* y *Acanthogonatus centralis*.
- 2.2.
- 2.3. Determinar el contenido de grasa corporal y musculatura de patas y comparar las diferencias entre machos y hembras en *Acanthogonatus centralis*.
- 2.4. Analizar las diferencias inter-sexuales en la respuesta inmune genérica a través de la encapsulación melánica de implantes en *Grammostola vachoni* y *Acanthogonatus centralis*.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. *Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio*

Se colectaron juveniles de *Acanthogonatus centralis*, *Plesiopelma longisternale* y machos inmaduros de *Grammostola vachoni* en Sierra de la Ventana (38°4'20,40'' S, 62°3'8,12'' O) durante los inviernos del 2013, 2014 y 2015. Hembras de *G. vachoni* fueron utilizadas de la cría del laboratorio de Zoología de Invertebrados II.

Una vez llevados al laboratorio los ejemplares de *A. centralis* se acondicionaron individualmente en cajas de Petri de plástico con sustrato de tierra y un algodón embebido como bebedero. Cada ejemplar de *P. longisternale* se acondicionó en recipientes individuales de plástico (10 cm diámetro x 5 cm), con base de tierra y un pequeño recipiente como bebedero. *Grammostola vachoni* se mantuvo en recipientes de acuerdo a su tamaño con base de tierra y un pequeño recipiente como bebedero.

Los individuos se alimentaron una vez a la semana con *Gryllus assimilis* (Orthoptera, Gryllidae), *Blatella germanica* (Blattodea, Blatellidae), *Blaptica dubia* (Blattodea, Blaberidae), *Shelfordella tartara* (Blattodea, Blattidae) o larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). El fotoperiodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

#### 3.2. *Diseño de los experimentos*

##### 3.2.1. *Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal*

Los individuos se pesaron en balanza digital Ohaus PA313 Explorer (precisión 0,001). El ancho y largo del cefalotórax (Hénaut *et al.* 2015) de los individuos adultos se calculó utilizando el programa tpsDig2 versión 2.18 (Rohlf 2004).

### 3.2.2. Calculo de contenido de grasas y músculo e índice de condición corporal

Luego de los procedimientos del capítulo 3, machos y hembras de *A. centralis* se sacrificaron con frío y se diseccionaron para obtener los contenidos de grasa corporal y musculatura de las patas. Siguiendo a Moya-Laraño y colaboradores (2003) se consideró el radio ancho del abdomen/ ancho del cefalotórax como un indicador de la condición corporal, el cual es una medida indirecta de las reservas de energía y nutrientes almacenados en el abdomen.

Siguiendo los lineamientos metodológicos de Aisenberg y Peretti (2011), se determinó el contenido de grasa como la diferencia entre el peso seco presente antes y después de proceder con la extracción de la grasa del cuerpo del individuo. Con el fin de obtener el peso seco inicial, se colocaron los individuos en conos de papel y se los introdujo en un recipiente con cloruro de potasio en la base como desecador por 24 horas. En los siguientes días se registró los pesos (balanza Acculab con precisión de 0.0001 mg) hasta obtener tres valores consecutivos que diferían de menos de 0,0003 gramos para cada espécimen. La extracción de grasa se realizó luego de colocar a las muestras durante 24 horas en tubo de ensayo conteniendo cloroformo y nuevamente secadas en los conos de papel en el recipiente con cloruro de potasio como desecador, siguiendo los pasos mencionados arriba.

La musculatura de patas se determinó como la diferencia entre el peso total de las patas secas luego de la extracción de grasa y el peso de esas patas luego de la extracción de músculo. Las ocho patas de cada espécimen sin grasa se lavaron con agua destilada y se sumergieron en KOH al 4% por 24 horas para provocar la lisis

muscular. Luego las patas se secaron en un recipiente con cloruro de potasio durante 24 horas y se pesaron siguiendo el procedimiento descrito arriba.

### 3.2.3. Respuesta inmune

Se colocó un implante en abdomen para registrar la cobertura e intensidad de la respuesta inmune genérica, siguiendo el protocolo de Aisenberg y Peretti (2011). Así, se introdujo como agente extraño un filamento de nylon esterilizado (0,08 de diámetro y 1 cm de largo) en la zona abdominal cercana al surco epigástrico. Los individuos se mantuvieron inmovilizados y el implante se extrajo a las 24hs. A los fines de cuantificar el porcentaje de encapsulamiento melanínico producido por el individuo sobre el implante, éste se fotografió bajo lupa estereoscópica con cámara acoplada al ocular. Se tomaron dos fotografías por implante, una de cada lado (rotándolo 180°) y manteniendo el aumento y el nivel de iluminación constantes. Se calculó el porcentaje de cobertura de melanina sobre el área total del implante y la intensidad en escala de grises de la encapsulación. Posteriormente los implantes se conservaron en alcohol al 80%. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.45 (Schneider *et al.* 2012).

### 3.3. *Análisis estadísticos*

Variables continuas con distribución normal se analizaron con el test t para muestras independientes. Variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad (vía Test de Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianzas (vía Test de Levene) se analizaron utilizando test no paramétricos (Mann-Whitney U-test para muestras independientes). Los resultados se indican como media  $\pm$  desvío estándar. Se aplicaron análisis de regresión simple para relaciones de las variables. Para el análisis de estos resultados se utilizó el paquete estadístico PAST v.3.02 (Hammer *et al.* 2001).

#### 4. Resultados

##### 4.1. Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal

Datos del largo y ancho del cefalotórax de *G. vachoni*, *P. longisternale* y *A. centralis* se muestran en tabla 1. Las hembras de *G. vachoni* son estadísticamente más grandes que los machos (Largo cefalotórax  $t=1,912$ ;  $p<0,05$ ; Ancho cefalotórax  $t=2,909$ ;  $p<0,01$ ). Las hembras de *P. longisternale* con respecto al tamaño no mostraron diferencias con los machos (Ancho cefalotórax  $t=0,902$ ;  $p= 0,33$ ; Largo cefalotórax  $t=0,48$ ;  $p= 0,62$ ). Las hembras de *A. centralis* son estadísticamente más grandes que los machos (Largo cefalotórax  $z= -8,669$ ;  $p<0,005$ ; Ancho cefalotórax  $z= -8,32$ ;  $p<0,001$ ).

Datos del peso de *G. vachoni*, *P. longisternale* y *A. centralis* se muestran en tabla 1. Las hembras de *G. vachoni*, *P. longisternale* y *A. centralis* son estadísticamente más pesadas que los machos ( $t=3,22$ ;  $p<0,001$ ,  $t=2,909$ ;  $p<0,01$ ,  $z=-10,086$ ;  $p<0,001$ ).

##### 4.2. Cálculo de contenido de grasas y músculo e índice de condición corporal

Las hembras de *A. centralis* mostraron mayor condición corporal y reserva de grasas (%) no así musculatura en patas (%) que los machos (Tabla 2). Con respecto a las reservas de grasas, estas se relacionaron con el Índice corporal en machos ( $R^2= 0,284$ ;  $df=1,18$   $F=7,16$ ;  $p <0,05$ ), pero esta relación no se halló en las hembras ( $R^2= 0,101$ ;  $df=1,18$   $F=2,019$ ;  $p=0,172$ ).

##### 4.3. Respuesta inmune

En *A. centralis* se observó la encapsulación tanto en hembras ( $n=16$ ) como en machos ( $n=14$ ). En *G. vachoni* se observó la encapsulación tanto en hembras ( $n=10$ ) como en machos ( $n=5$ ). Las hembras de *A. centralis* no mostraron diferencias en el

porcentaje de encapsulación con los machos ( $t=0,570$   $p=0,572$ ) (Fig. 1 a). Con respecto a la intensidad de encapsulación medida en pixeles, tampoco se encontraron diferencias entre machos y hembras de *A. centralis* ( $z = -1,019$ ;  $p= 0,308$ ) (Fig. 1 b). Las hembras de *G. vachoni* mostraron mayor porcentaje de encapsulación que los machos pero sin diferencias estadísticas ( $t= 0,298$ ;  $p= 0,770$ ) (Fig. 2 a). En cuanto a la intensidad de encapsulación medida en pixeles, no se encontraron diferencias entre machos y hembras de *G. vachoni* ( $t= -1,833$ ;  $p= 0,089$ ) (Fig. 2 b).

Tabla 1. Variables morfométricas de las tres especies de estudio. Pesos en gramos y medidas en milímetros. Los datos corresponden a medias  $\pm$  desvío estándar y el rango.

	<b>PESO</b>	<b>LARGO DEL CEFALOTÓRAX</b>	<b>ANCHO DEL CEFALOTÓRAX</b>
<i>Grammostola vachoni</i>			
<b>HEMBRA</b>	11,03 $\pm$ 2,39	20,61 $\pm$ 2,97	17,83 $\pm$ 2,24
	(7,75 - 15,90)	(16,80 - 25,49)	(15,70 - 21,46)
	N= 14	N= 14	N= 14
<b>MACHO</b>	7,25 $\pm$ 1,37	18,37 $\pm$ 1,11	15,24 $\pm$ 0,93
	(6,23 - 15,90)	(16,50 - 25,49)	(13,81 - 21,46)
	N=5	N=7	N=7
<i>Plesiopelma longisternale</i>			
<b>HEMBRA</b>	1,36 $\pm$ 0,34	9,32 $\pm$ 1,08	7,79 $\pm$ 0,90
	(0,71 - 2,12)	(7,60 - 11,30)	(6 - 8,84)
	N= 17	N= 18	N= 18
<b>MACHO</b>	1,002 $\pm$ 0,21	9,13 $\pm$ 0,75	7,58 $\pm$ 0,78
	(0,74 - 1,29)	(8,34 - 10,59)	(8,34 - 10,59)
	N=10	N=10	N=10
<i>Acanthogonatus centralis</i>			
<b>HEMBRA</b>	0,58 $\pm$ 0,14	7,17 $\pm$ 0,83	5,56 $\pm$ 0,57
	(0,27 - 0,91)	(5,63 - 10,72)	(3,59- 6,90)
	N= 61	N= 56	N= 56
<b>MACHO</b>	0,24 $\pm$ 0,06	5,72 $\pm$ 0,58	4,58 $\pm$ 0,45
	(0,16 - 0,46)	(4,60 - 7,78)	(3,68 - 6,06)
	N=87	N=81	N=81

Tabla 2. Valores medios y desvíos estándar de condición corporal, porcentajes de reserva de grasas y musculo en machos y hembras de *Acanthogonatus centralis*, y resultado de la comparación estadística entre los grupos.

	HEMBRAS (N=40)	MACHOS (N=40)	HEMBRAS VS. MACHOS
Condición Corporal	1,24 ± 0,11	0,82 ± 0,11	t= 11,68 p < 0,001
Reserva de grasa (%)	12,581 ± 6,62	9,461 ± 4,90	z= -2,0255 p < 0,05
Musculatura de patas (%)	69,96 ± 6,39	69,535 ± 5,78	z = -0,61104 p=0,5418

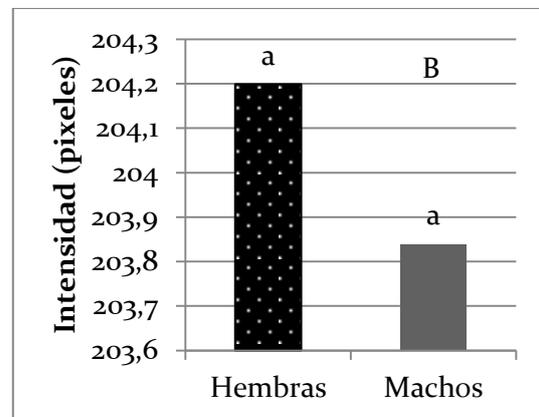
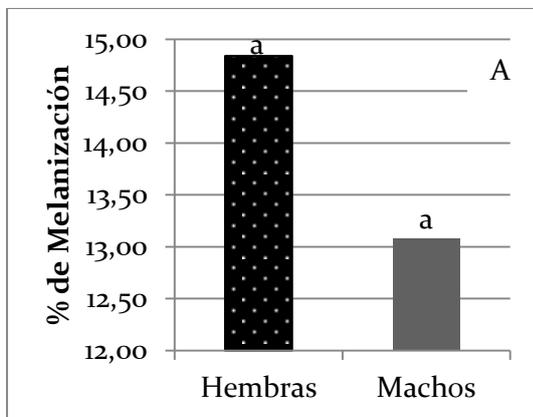


Figura 1. *Acanthogonatus centralis*. A) porcentaje de cobertura del implante en machos y hembras. B) intensidad de la cobertura en los implantes de machos y hembras.

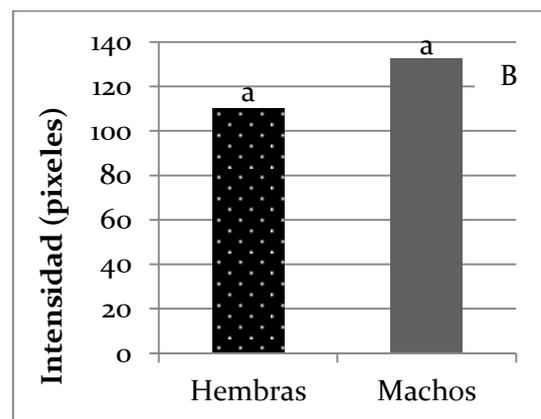
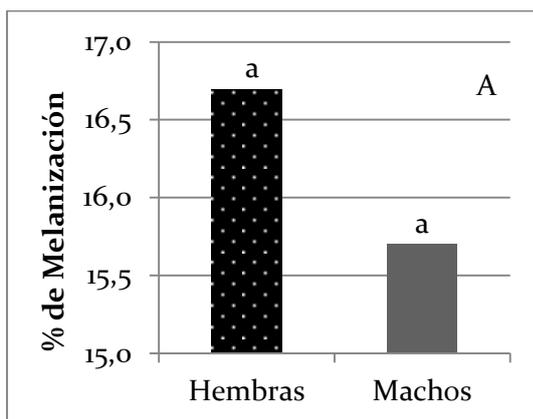


Figura 2. *Grammostola vachoni*. A) porcentaje de cobertura del implante en machos y hembras. B) intensidad de la cobertura en los implantes de machos y hembras.

## 5. Discusión

### 5.1. *Dimorfismo sexual en tamaño y peso corporal*

Por medio de este trabajo se pudo confirmar la existencia de dimorfismo sexual en el tamaño corporal, con tendencia hacia hembras más grandes, en las tarántulas *G. vachoni*, *P. longisternale* y la nemésida *A. centralis*.

El dimorfismo sexual en tamaño se considera moderado cuando los sexos difieren en un 10 % o menos, lo cual se observa en la mayoría de los animales y plantas del planeta y también se ha observado en este estudio (Andersson 1994; Fairbairn *et al.* 2007).

Intentando interpretar los resultados obtenidos, en primer término cabe señalar que el dimorfismo sexual en tamaño tiene su origen en una combinación de factores y presiones selectivas (Grossi *et al.* 2016). Por un lado, la hipótesis de fecundidad podría explicar el origen, siendo que las hembras aumentan su tamaño en correlación con el aumento del tamaño de la descendencia (Head 1995; Prenter *et al.* 1999). Por otro lado, la explicación podría basarse en que los machos reduzcan su tamaño, para lo cual se han postulado varias hipótesis (ver: Elgar *et al.* 2003; Grossi & Canals 2015; Moya-Laraño *et al.* 2002; Reiss 1989; Vollrath & Parker 1992). Hormiga y colaboradores (2000) asumen que el dimorfismo sexual en el tamaño puede deberse a una combinación del incremento de la hembra y la disminución en el tamaño del macho o un crecimiento en los dos sexos pero a diferentes tasas; y consideran que el rasgo mono-mórfico en las arañas es una condición primitiva y el dimorfismo un carácter derivado.

El dimorfismo sexual en migalomorfas cuenta con pocos estudios, la mayoría en tarántulas, donde las hembras presentan mayor tamaño que los machos como en este estudio (Grossi *et al.* 2016; Pérez-Miles 1989; Shillington 2005). Hénaut y colaboradores (2015) encontraron poblaciones con hembras pequeñas de *Brachypelma vagans* (Theraphosidae) y lo asociaron con un alto grado de competencia intraespecífica, es decir muchos individuos compitiendo por un mismo recurso, el resto de las poblaciones de esta especie dentro del trabajo mostró un dimorfismo con tendencia femenina.

Tanto machos adultos de *Aphonopelma anax* (Shillington & Peterson 2002) y *B. vagans* (Hénaut *et al.* 2015) mostraron evidencia de dimorfismo en largo de tibia (piernas más largas) y en sus abdómenes (abdomen reducidos) probablemente como resultado de presiones selectivas relacionadas a roles reproductivos de los machos caminantes. Este tipo de dimorfismo también se observó en otras arañas como *Donacosa merlini* (Lycosidae), donde patrones de diferencias en las formas sugieren que el dimorfismo sexual en esta especie es también el resultado de selección sobre el estilo de vida y roles reproductivos del macho y la hembra (Fernández-Montraveta & Marugán-Lobón 2017). La tarántula *Grammostola rosea* presenta dimorfismo sexual en el tamaño con machos maduros activos, que se caracterizan por tener cuerpo pequeño y patas más largas que las hembras sedentarias, lo que se relaciona con costos de transporte bajos, alta velocidad y mejor destreza en la locomoción (Grossi *et al.* 2016).

## 5.2. Cálculo de contenido de grasas y músculo e índice de condición corporal

Se encontró que las hembras de *A. centralis* poseen mayor el índice de condición corporal y porcentaje de grasas que los machos. Existen tres rasgos, no inmunológicos, energéticamente costosos en los animales, ellos son las reserva de grasas en adultos, la masa muscular y el peso corporal. Cuando los animales tienen una dieta baja en proteínas se ve afectada su reserva de grasa y de musculatura, indicando que estas reservas son muy costosas (Córdoba-Aguilar *et al.* 2016). En las arañas, las hembras forman la yema de los huevos en dos pasos, primero (antes de la cópula) las partículas de la yema se empiezan a formar mientras el huevo crece, por lo que las hembras poseen mayores proporciones de proteínas y lípidos en sus abdomen que los machos (Foelix 2011). Los machos adultos de muchas especies de arañas no se alimentan y por lo tanto sus abdómenes comienzan a encogerse a medida que las reservas se consumen. Lo que también se aplica al largo general del cuerpo, el cual depende principalmente del largo del abdomen (Foellmer & Fairbairn 2005) por esta razón, el peso del cuerpo y las características del abdomen son utilizados como rasgos indicadores de la condición corporal que presentan los individuos (Foellmer & Fairbairn 2005; Moya-Laraño 2002; Moya-Laraño *et al.* 2008).

En la mayoría de las migalomorfas, los machos adultos abandonan su cueva y salen en búsqueda de pareja donde caminan grandes distancias abarcando un gran área geográfica (Shillington & Peterson 2002) aumentando su éxito reproductivo y dispersión de genes. Esto implica una demanda energética alta, con una tasa metabólica alta mayor que la de las hembras. Patrones complejos de inversión también se observaron en *Lycosa tarantula* donde una dieta no balanceada afecta diferente a

machos y hembras (Moya-Laraño *et al.* 2008). Machos bien alimentados mantienen su peso destinando los recursos hacia la búsqueda de parejas mientras que las hembras bien alimentadas aumentan su peso principalmente a través del almacenamiento de proteínas para el desarrollo de huevos (Moya-Laraño *et al.* 2008).

### 5.3. Respuesta inmune

En el presente estudio se pudo observar que tanto machos como hembras de *G. vachoni* y *A. centralis* mostraron similares niveles de encapsulación melánica. En insectos, la respuesta inmune es costosa porque su expresión está genética y fisiológicamente relacionada a otras características inmunológicas y de la historia de vida (Sheldon & Verhulst 1996). Cuando los recursos en la dieta son limitados y compartidos para desarrollar varios rasgos, se espera que exista un “tradeoffs” entre el sistema inmune y otras características de la historia de vida (Sheldon & Verhulst 1996). Sin embargo los individuos en buenas condiciones nutricionales son capaces de producir una respuesta inmune efectiva (Stillwell *et al.* 2010).

Según la hipótesis de asignación de recursos, si los recursos para la reproducción y la función inmune son limitados, la inversión en uno de ellos lleva a la reducción en la otra actividad (Sheldon & Verhulst 1996); así el esfuerzo reproductivo de un individuo puede llevar al incremento de patógenos, debido a una reducción en los recursos asignados a la defensa (Sheldon & Verhulst 1996).

Tres hipótesis explican el dimorfismo con respecto al sistema inmune asumiendo que ésta requiere un alto costo. La primera se basa en las presiones de la selección sexual, donde machos invierten principalmente en la competencia con otros machos, lo que resulta en la reducción de disponibilidad de recursos para las

funciones inmunes (Schulenburg *et al.* 2009; Zuk & McKean 1996). La segunda asume que las hembras verán incrementada su supervivencia, en consecuencia con alta prioridad a la inmunidad, como una forma para maximizar la producción exitosa de huevos (Schulenburg *et al.* 2009; Zuk & Stoehr 2002). Por último, la tercera hipótesis sugiere que la inmunidad es flexible, dependiendo de la disponibilidad de recursos y los cambios de cada sexo en relación con las oportunidades reproductivas (McKean & Nunney 2001), por lo que la alimentación está altamente relacionado con la respuesta inmune que un animal puede generar (Stillwell *et al.* 2010).

Siguiendo la tercera hipótesis, la similitud hallada en la respuesta inmune en *G. vachoni* y *A. centralis*, pueda deberse a una buena condición de los machos al inicio del periodo reproductivo, a diferencia de los visto en otras arañas donde los machos presentan menor respuesta que las hembras (Calbacho-Rosa *et al.* 2012). Los machos de ambas especies tienen periodos reproductivos de varios meses, donde la ingesta de comida y la hidratación se ven reducidas, quizás durante su maduración los machos inviertan al igual que las hembras en recursos inmunológicos para poder aumentar su resistencia y longevidad, pudiendo así copular con mayor cantidad de hembras.

En conclusión *G. vachoni*, *P. longisternale* y *A. centralis* poseen un dimorfismo sexual en tamaño moderado, donde las hembras son más grandes que los machos. Además las hembras de *A. centralis* poseen mayor porcentaje de grasas e índice corporal que los machos, aunque se encontraron iguales porcentajes de musculatura en patas. Por último las hembras de *A. centralis* y *G. vachoni*, no mostraron superior inmunidad que los machos frente a un agente extraño. Estas características concuerdan, en su mayoría, con el estilo de vida de estas especies; donde en estado adulto los machos abandonan sus refugios, se convierten en caminantes y salen en

búsqueda de hembras, favoreciendo la selección a un cuerpo más pequeño, ágil, con un alto consumo energético y buenas defensas inmunológicas. En tanto que las hembras permanecen sedentarias en sus cuevas, aumentando sus reservas de grasa, con aumento del peso, seleccionado para producir mayor cantidad de huevos y aumentar así su descendencia.

Capítulo V

# Una Primera Aproximación al Comportamiento Sexual Inter-poblacional

## 1. Introducción

Los patrones de comportamiento exhibidos por cada sexo durante el cortejo y el apareamiento son de particular interés por ser diversos, complejos y ostentosos, además de que juegan un rol esencial en el reconocimiento de parejas sexuales (Darwin 1871; Andersson 1994; Verrell and Mabry 2003). Las interacciones sexuales involucran ricos intercambios de comunicación (Coyne & Orr 2004), especialmente durante el cortejo, en el cual se involucran un intercambio de señales en varias modalidades sensoriales como visuales, acústicas, químicas, táctiles conjuntamente con la transmisión de información acerca de la calidad y la identidad de las especies (Candolin 2003; Choe & Crespi 1997; Hebets & Papaj 2005; Olivero *et al.* 2015; Simmons 1988; Virant-Doberlet & Cokl 2004). Dentro de las funciones del cortejo se identifican la orientación de las parejas en el espacio, la sincronización en el tiempo y la persuasión de las parejas para incrementar la motivación sexual; así como también la evaluación entre las potenciales parejas sexuales (Tinbergen, 1953; Verrell & Mabry, 2003).

En general, dentro de una misma especie se espera encontrar que los comportamientos reproductivos muestren similares patrones, y paralelamente que difieran de aquellos patrones que presentan individuos de otras especies (Barlow 2002). A pesar de esto, se puede esperar que los comportamientos sexuales posean cierto nivel de variación intraespecífica, como diferencias en la ocurrencia, frecuencia y duración de las tácticas llevadas a cabo por los integrantes de una especie (Foster & Endler 1999).

El comportamiento evoluciona rápidamente en respuesta a cambios ambientales, lo que lo convierte en una característica fácil de detectar en eventos de

especiación (Barlow 2002). A partir de divergencias en las señales sexuales del macho y la correspondiente preferencia de la hembra, el aislamiento reproductivo se puede hacer más incipiente (Arnqvist & Rowe 2005; Lande 1981; Panhuis *et al.* 2001). Diferencias entre los hábitats pueden generar divergencias en la selección de grupos en la naturaleza, resultando en el aislamiento reproductivo de las poblaciones (Mayr 1942, 1963; Schluter 2000).

La especiación sucede cuando evoluciona el aislamiento reproductivo entre poblaciones; este proceso puede ocurrir en alopatria (cuando las poblaciones se encuentran separadas geográficamente) o en simpatria (cuando la separación es a través de barreras reproductivas) (Coyne & Orr 2004).

Estudios realizados en diferentes grupos de insectos y arácnidos han mostrado que poblaciones de una sola especie pueden comenzar la diferenciación morfológica y genética como resultado de una distribución alopátrica, alcanzando aislamiento reproductivo después (Holwell 2008; Postiglioni & Costa 2006; Yamashita & Polis 1995). Variaciones geográficas en los comportamientos sexuales han sido reportados en muchos taxones como en ranas (Amézquita *et al.* 2009; Ryan *et al.* 1990), serpientes (Foster & Endler 1999), peces (Ishikawa *et al.* 2006), caracoles (Kupfernagel & Baur 2011), insectos (Briceño *et al.* 2007), escorpiones (Olivero *et al.* 2015, 2017), y arañas (Elias *et al.* 2006; González *et al.* 2013; Miller *et al.* 1998).

En organismos que poseen una limitada capacidad para dispersarse, el potencial para la divergencia es más alto, creándose rápidamente diferencias a través de una pequeña escala espacial, lo que resulta en endemismos de cortos rangos (Harvey 2002). En las arañas del Infraorden Mygalomorphae la dispersión es limitada por sus largos tiempos generacionales, nichos ecológicos y su habilidad limitada de la

utilización del “ballooning” como estrategia de dispersión, lo que las hace altamente susceptibles a la especiación por eventos vicariantes y/o divergencias parapátricas (Bond *et al.* 2001; Crews & Hedin 2006; Ferretti *et al.* 2013b; Leavitt *et al.* 2015; Wong *et al.* 2017).

El neotrópico presenta una alta diversidad y regiones complejas en términos de clima, exhibiendo un mosaico de condiciones ambientales las cuales resultan en complejas presiones selectivas dentro del taxón, produciendo diversos y únicos comportamientos reproductivos y características morfológicas (Bollatti *et al.* 2017; Macedo & Machado 2014).

Argentina pertenece a la región Neotropical y se la divide en varias provincias biogeográficas que coinciden con las principales fisonomías de los biomas (Morrone 2001). Tanto las arañas *Acanthogonatus centralis* (Goloboff 1995), *Grammostola vachoni* (Schiapelli & Gerschman 1961) y *Plesiopelma longisternale* (Schiapelli & Gerschman 1942) poseen una amplia distribución dentro de los sistemas serranos de la Argentina abarcando diferentes provincias biogeográficas: *P. longisternale* se la encuentra en las provincias del Chaco, del Monte, de la Pampa y del bosque Paranaense; *G. vachoni* en las provincias de Patagonia Central, del Chaco, del Monte y de la Pampa y; *A. centralis* en las provincias del Chaco, del Monte y de la Pampa (Ferretti *et al.* 2014b). Las especies mencionadas presentan distribuciones asociadas a los sistemas serranos del centro de Argentina (Córdoba y Ventania), perteneciendo al arco Peripampásico. Dicho sistema describe un arco que comienza en el sur de Brasil, continúa en las sierras del sureste de Uruguay, luego en Argentina en la provincia de Buenos Aires en los sistemas serranos de Tandilia y Ventania, las sierras de las provincias de Córdoba y San Luis, para

finalizar en las sierras Sub-Andinas de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Ferretti *et al.* 2012a).

A pesar de esto, se desconoce la capacidad de cruce entre dichas poblaciones. Se plantea que las tarántulas *Plesiopelma longisternale* y *Grammostola vachoni*, y la nemésida *Acanthogonatus centralis*, las tres con amplia distribución geográfica, al experimentar una serie de diferentes valores en variables ambientales, presentan considerable variación inter-poblacional en su historia natural, incluyendo su comportamiento de apareamiento. El presente capítulo se enfoca en proporcionar una primera aproximación al estudio de esta temática en migalomorfos locales. Para tal fin, se llevaron a cabo experiencias de inter-cruzamiento preliminares en *P. longisternale* y *G. vachoni*, en tanto en *A. centralis* registros de la existencia de cortejo masculino sobre telas de hembras. Los datos aquí proporcionados sientan las bases para futuros estudios experimentales más concretos en estos modelos a nivel inter-poblacional.

## 2. Objetivos

- 2.1. Determinar el grado de diferenciación en el cortejo de cada población por medio de la observación del comportamiento del macho sobre tela de hembras de la misma u otra población en *A. centralis*.
  
- 2.2. Examinar de manera preliminar el grado de entrecruzamiento factible en dos poblaciones distantes a través de pruebas de cortejo en el laboratorio de las especies de *Grammostola vachoni* y *Plesiopelma longisternale*.
  
- 2.3. Discutir sobre la base de los objetivos previos una primera comparación del comportamiento sexual en dos poblaciones distantes de las especies de Mygalomorphae seleccionadas.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. *Colecta de individuos y mantenimiento en el laboratorio*

Se recolectaron manualmente arañas de dos regiones serranas de la Argentina; las Sierras de Córdoba y del Sistema de Ventania (Fig. 1). Las Sierras de Córdoba corresponden a la ecorregión de la sabana montañosa cordobesa, mientras que el Sistema de Ventania pertenece la pampa semiárida (tomado de eco-regiones terrestres (2017) <http://www.worldwildlife.org/biome-categories/terrestrialecoregions>). Los muestreos en la Localidad “Córdoba” se realizaron en las localidades de Ascochinga (30°56'28,9"S - 64°18'36,6"O) (409 m); Calamuchita (32° 4'21,80"S - 64°31'11,70"O); Camino del Cuadrado (31°07'21,2"S - 64°21'51,7"O) (1020 m); Flor Serrana (Tanti) (31°23'01,1"S - 64°35'39,9"O) (893 m); Pampilla (El Cóndor) (31°35'54,1"S - 64°42'49,5"O) (1817 m); y San Marcos (30°48'49,27"S - 64°36'55,32"O). Los muestreos en la localidad “Ventania” se realizaron en la localidad de Sierra de la Ventana (38°09'S - 61°48'O). Las arañas se llevaron al laboratorio de Zoología de Invertebrados II, Universidad Nacional del Sur, donde se acondicionaron en recipientes con sustrato de tierra y contenedor de agua. Se mantuvieron en condiciones de 12 hs luz/ 12 hs oscuridad y la temperatura media del laboratorio fue de 26,4 °C ± 2,09 (media ± DE). Una vez por semana los ejemplares se alimentaron a base de una dieta variada compuesta de larvas (*Zophoba* sp. (Tenebrionidae)), cucarachas (*Blaptica dubia* y *Blatella germanica* (Blattodea)) y grillos (*Acheta domestica* (Orthoptera)).

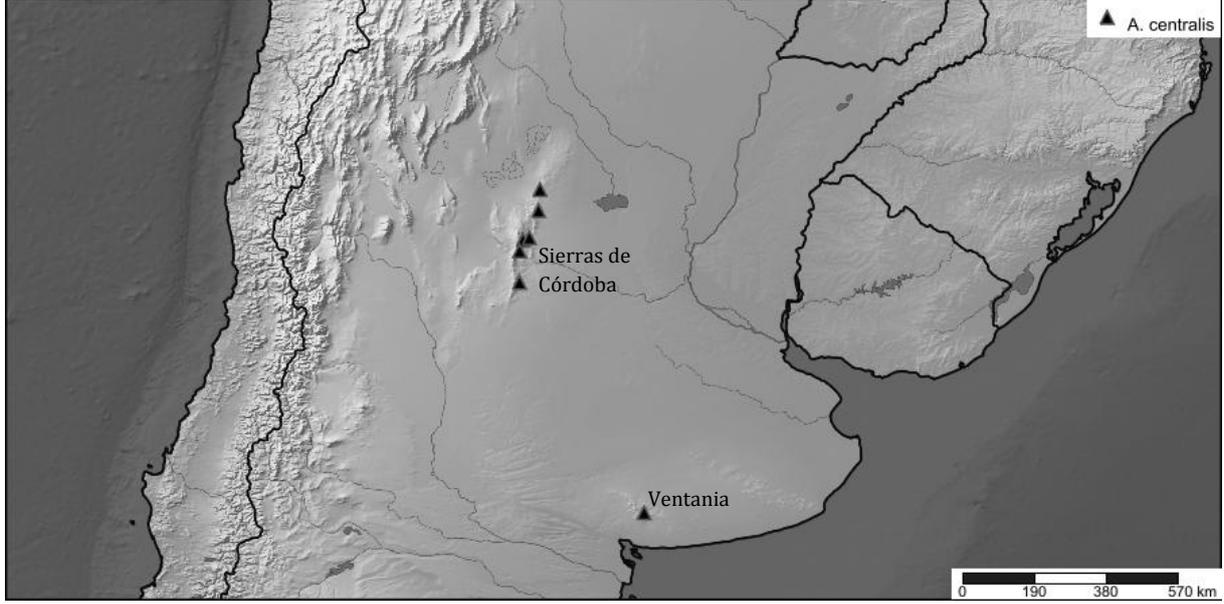
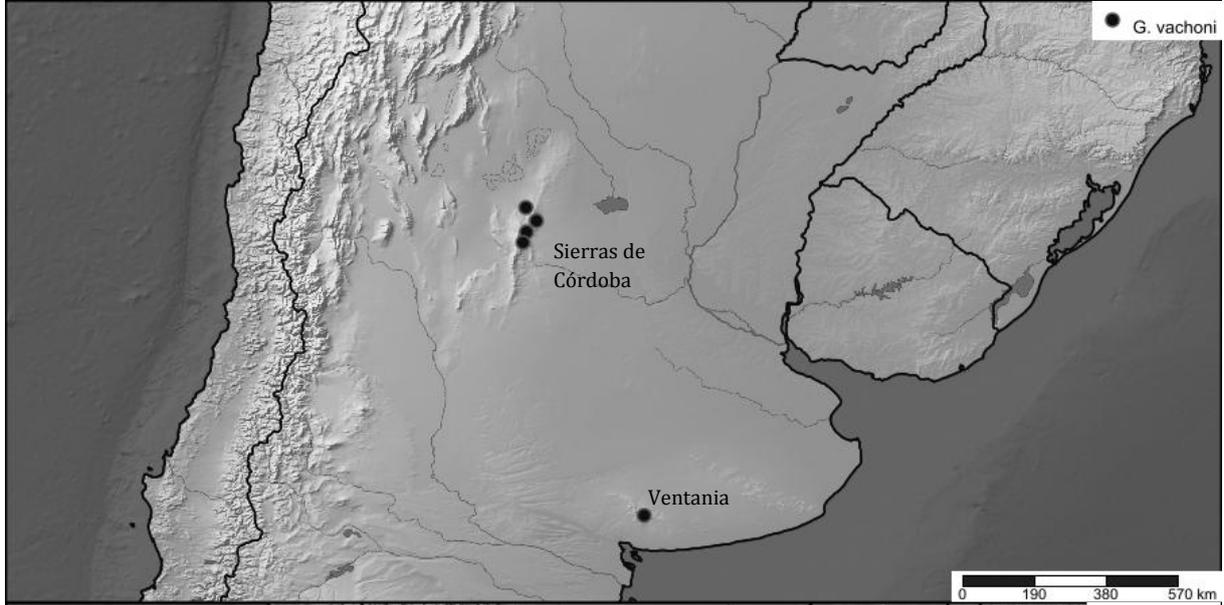
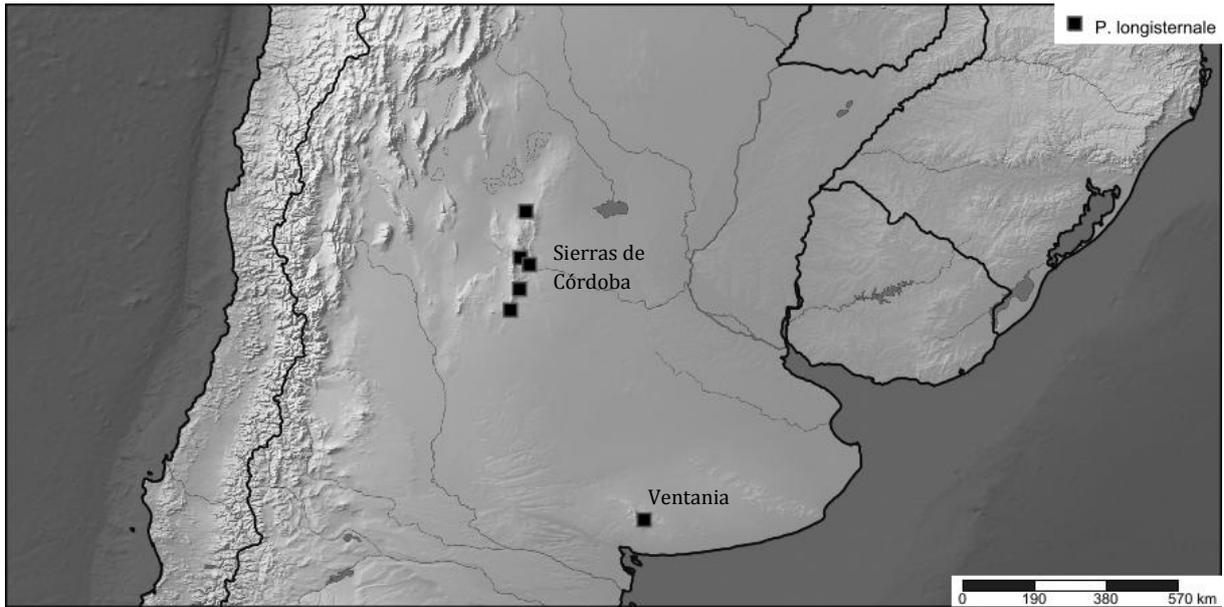


Figura 1. Cada mapa contiene los puntos de las localidades donde se recolectaron las especies para este trabajo. Mapa editado en <http://www.simplemappr.net> (Shorthouse 2010).

### 3.2. Criterio de observación de secuencias de comportamiento y cópula

Todas las interacciones fueron grabadas con una cámara de video digital Panasonic SDR-S7 colocada cuidadosamente lo que permite una visión en primer plano de los movimientos de los machos durante el cortejo y la cópula. Los eventos se analizaron a partir de videos digitales con el programa JWatcher 0.9 (Blumstein et al. 2000). Para los patrones de comportamiento observados durante el cortejo (Capítulo 1), se calcularon la frecuencia absoluta que fue el número total de ocurrencias (Martin & Bateson 1993). La duración de la latencia de cortejo, del cortejo y la cópula se estimó en segundos. Se registró el número y duración relativa de las inserciones del macho. Todas las interacciones se realizaron en el laboratorio de Zoología de Invertebrados II, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

### 3.3. Diseño de los experimentos

#### 3.3.1. Cortejo masculino sobre telas de hembras a nivel intra e interpoblacional en *Acanthogonatus centralis*

Los ensayos consistieron en el registro de la actividad del macho durante 10 minutos luego de ser colocados suavemente en la arena que contiene la tela de la hembra. Las arenas constaron de cajas de Petri con una delgada capa de tierra como sustrato. Las hembras vírgenes se colocaron en las cajas durante la semana previa a los ensayos. Este tiempo se consideró suficiente para que las hembras construyeran el tubo de seda que actúa como refugio y depositaran seda sobre el sustrato. La hembra fue retirada de las arenas dos minutos antes de ubicar al macho. Se realizaron

comparaciones intra e interpoblacionales en cuanto al cortejo desplegado por los machos. Se lograron efectuar los siguientes cruzamientos intra-poblacionales: tres hembras de la población de Córdoba vs. tres machos de la población de Córdoba ( $\text{♀C-}\mathfrak{♂}\text{C}$ ) (N=6) y cinco hembras de la población de Ventania vs. diez machos de la población de Ventania ( $\text{♀V-}\mathfrak{♂}\text{V}$ ) (N=10). Como cruzamiento inter-poblacionales: cinco hembras de la población de Córdoba vs. ocho machos de la población de Ventania ( $\text{♀C-}\mathfrak{♂}\text{V}$ ) (N=8) y ocho hembras de la población de Ventania vs. tres machos de la población de Córdoba ( $\text{♀V-}\mathfrak{♂}\text{C}$ ) (N=13). Aunque los individuos se reutilizaron, no se repitieron parejas en los cruces.

### 3.3.2. Interacciones sexuales en *Plesiopelma longisternale*

Se realizaron comparaciones de cortejo y cópula entre individuos de las dos poblaciones de *P. longisternale*. Tres machos de Sierra de la Ventana y tres machos de Córdoba se cruzaron con cinco hembras de cada población. Se efectuaron los siguientes cruzamientos: hembras de la población de Córdoba vs. machos de la población de Ventania ( $\text{♀C-}\mathfrak{♂}\text{V}$ ) (N=10) y hembras de la población de Ventania vs. machos de la población de Córdoba ( $\text{♀V-}\mathfrak{♂}\text{C}$ ) (N=8). Las hembras fueron colocadas dos días previos a las experiencias en terrarios de 35 cm x 15 cm x 30 cm de alto, con una capa de sustrato de 10 cm. Se construyó una cueva artificial contra el vidrio del recipiente para permitir la observación en detalle del comportamiento de la hembra. Los machos fueron depositados delicadamente en el extremo opuesto de la entrada de la cueva. Se registró el comportamiento de los individuos por 30 minutos o hasta finalizar la cópula.

### 3.3.3. Interacciones sexuales complementarias en *Grammostola vachoni*

Durante el periodo de la tesis no se obtuvieron hembras adultas de *G. vachoni* de las poblaciones de Córdoba, lo que imposibilitó el cruce completo de ambas poblaciones. A su vez solo dos machos inmaduros colectados en la localidad del Cóndor y en el Sector del Camino del Cuadrado (Córdoba) alcanzaron la madurez sexual en condiciones de laboratorio y se utilizaron en los siguientes ensayos.

Se realizaron comparaciones de cortejo y cópula entre individuos de *G. vachoni* de las dos poblaciones. Cinco hembras de la población de Ventania vs. dos machos de la población de Córdoba (HV-MC) (N=10) se cruzaron en todas las opciones posibles. Las hembras fueron colocadas 96 horas previas a las experiencias en terrarios de 35 cm x 30 cm x 30 cm de alto, con una capa de sustrato de 10 cm. Se construyó una cueva artificial contra el vidrio del recipiente para permitir la observación en detalle del comportamiento de la hembra. Los machos fueron depositados delicadamente en el extremo opuesto de la entrada de la cueva. Se registró el comportamiento de los individuos por 30 minutos o hasta finalizar la cópula. Se comparó lo registrado con los machos de *G. vachoni* de la población de Ventania.

### 3.4. *Análisis estadísticos*

Los comportamientos fueron comparados estadísticamente. Se chequeó la distribución normal los datos usando el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza con el test de Levene. Se utilizó el ANOVA y el Test de *t* en caso de muestras paramétricas y el Kruskal-Wallis y Test de la U de Mann-Whitney para muestras de

distribución no paramétrica. En todas las pruebas estadísticas se utilizó el programa Past v. 1.18 y el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2016).

#### 4. Resultados

##### 4.1. Cortejo masculino sobre telas de hembras a nivel intra e inter-poblacional en *Acanthogonatus centralis*

Los machos de Ventania y Córdoba frente a tela de hembras de su misma población realizaron cortejos similares sin diferencias estadísticas entre los dos grupos (contracciones:  $z=-1,08$ ,  $p=0,28$ ; repiqueteo:  $z=-0,917$ ,  $p=0,35$ ; rasgar:  $z=-1,23$ ,  $p=0,21$ ; y tironeo:  $z=0,22$ ;  $p=0,82$ ). Los machos de *A. centralis* de la población de Ventania cortejaron sobre la tela de las hembras de ambas poblaciones pero los machos de Córdoba cortejaron solo sobre la tela de hembras de Córdoba (Tabla 1). Los machos de Ventania no mostraron diferencias significativas en la latencia de cortejo cuando cortejan hembras de ambas poblaciones (Tabla 1). No se encontraron diferencias entre los cortejos realizados por los machos de sierra hacia las hembras de las dos poblaciones (contracciones:  $z=-0,29041$ ,  $p=0,77$ ; repiqueteo:  $z=-0,438$ ,  $p=0,66$ ; rasgar:  $z=-0,29041$ ,  $p=0,77$ ; y tironeo:  $z=-0,826$ ,  $p=0,40$ ). No se observaron diferencias estadísticas entre las unidades comportamentales de los tres grupos que cortejaron (contracciones:  $H=1,053$ ,  $p=0,583$ ; repiqueteo:  $H=0,9318$ ,  $p=0,612$ ; rasgar:  $H=2,483$ ,  $p=0,285$ ; y tironeo:  $H=0,8939$ ,  $p=0,549$ ) (Fig. 2).

Tabla 1. Porcentaje de cortejo realizado por los machos de *A. centralis* sobre tela de hembras y tiempo de latencia.

<b><i>A. centralis</i></b>	<b>% CORTEJO</b>	<b>Latencia de cortejo (seg)</b>	
♂ Córdoba ♀ Ventania	0	0	z= -0,367; p=0,71
♂ Córdoba ♀ Córdoba	50	51 ± 46,6	
♂ Ventania ♀ Córdoba	62,5	85,6 ± 98,12	
♂ Ventania ♀ Ventania	60	107,5 ± 108,01	

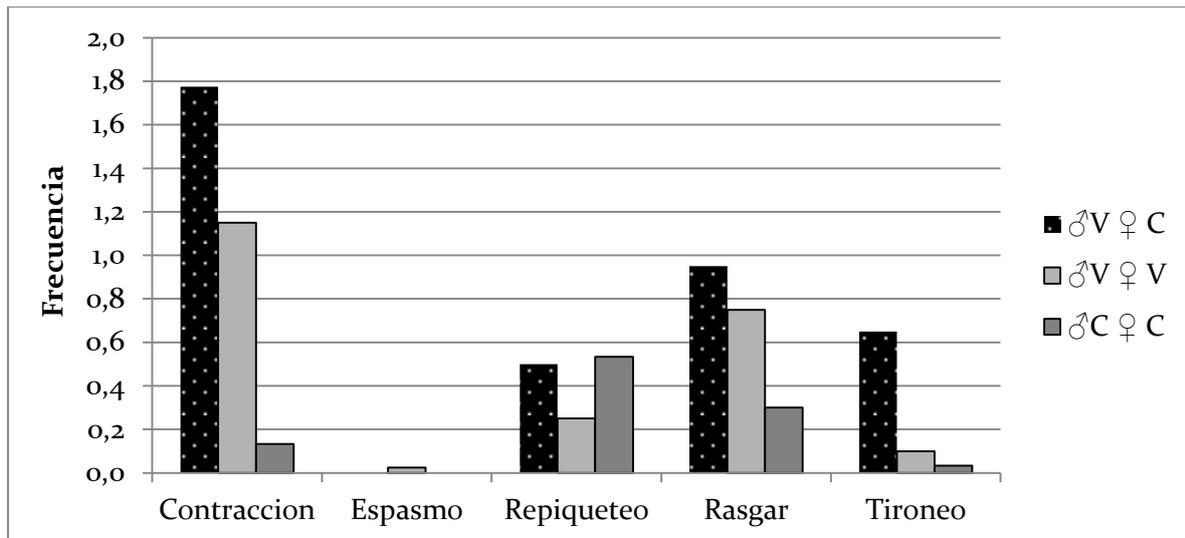


Figura 2. Frecuencia de cortejos entre los diferentes grupos de poblaciones de *A. centralis*. Frecuencia dada como cantidad de unidades de comportamiento por minuto.

#### 4.2. Interacciones sexuales en *P. longisternale*

Los machos de *P. longisternale* de ambas poblaciones cortejaron y copularon con hembras de poblaciones distantes (Tabla 2). Las hembras salieron de sus cuevas mostrando receptividad luego del cortejo de los machos. En una oportunidad en cada grupo, la hembra se mostró receptiva pero fue rechazada por el macho el cual se alejó luego del contacto. En el resto de los casos, la no receptividad de la hembra fue asumida luego de no salir de su cueva, o salir hacia la dirección contraria de la emisión de cortejo. Los machos de ambas poblaciones realizaron vibraciones corporales luego del contacto con la seda de las hembras, ya en contacto con la hembra efectuaron golpes espasmódicos, además de vibraciones corporales durante la cópula y luego de ésta. Una sola hembra de Sierra de la Ventana atacó a un macho de Córdoba, luego de una entrada abrupta en la cueva de la hembra sin previo cortejo. Las hembras de ambas poblaciones, luego de la cópula permanecieron catalépticas. No se hallaron diferencias en ambas poblaciones en la duración de la latencia de cortejo ( $t=-0,88724$ ;

p=0,38), del cortejo realizado por los machos ( $z = -1,4178$ ;  $p=0,15625$ ), de la cópula ( $t = -0,12668$ ;  $p = 0,90413$ ), de la catalepsis ( $z = -0,891$ ;  $p = 0,372$ ) y de las inserciones ( $t = 0,0046$ ;  $p = 0,9966$ ) (Fig. 3). No se observaron diferencias significativas en los cortejos de los machos ante hembras de diferente población (Fig. 4), en cuanto a las vibraciones realizadas antes del contacto corporal ( $t = 1,009$ ;  $p = 0,29$ ), las vibraciones realizadas por el macho durante la cópula ( $t = -0,31$ ;  $p = 0,76$ ), las vibraciones luego de finalizada la cópula ( $t = 2,21$ ;  $p = 0,07$ ) y los golpes espasmódicos que el macho realiza sobre la hembra luego del contacto y previo al enganche ( $t = -0,67$ ;  $p = 0,52$ ). Los individuos de ambas poblaciones no mostraron diferencias en el peso corporal y medidas morfológicas (Tabla 3).

Tabla 2. Porcentajes de cortejo, cópula y receptividad de las hembras en *P. longisternale*.

<i>P. longisternale</i>	% CORTEJO	% CÓPULAS	% ♀ RECEPTIVAS
<b>Localidades distantes</b>			
♂ Córdoba ♀ Ventania	80	30	50
♂ Ventania ♀ Córdoba	87,5	50	62,5

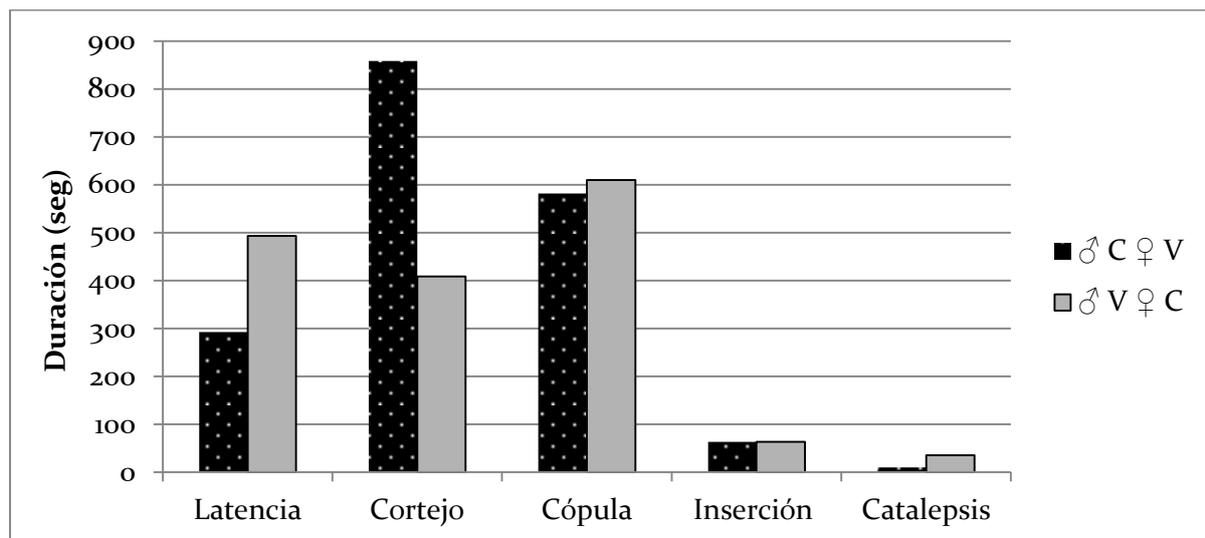


Figura 3. Duraciones promedio de latencia de cortejo, cortejo, cópula, inserciones y catalepsis de las interacciones de cruce de poblaciones de *P. longisternale*.

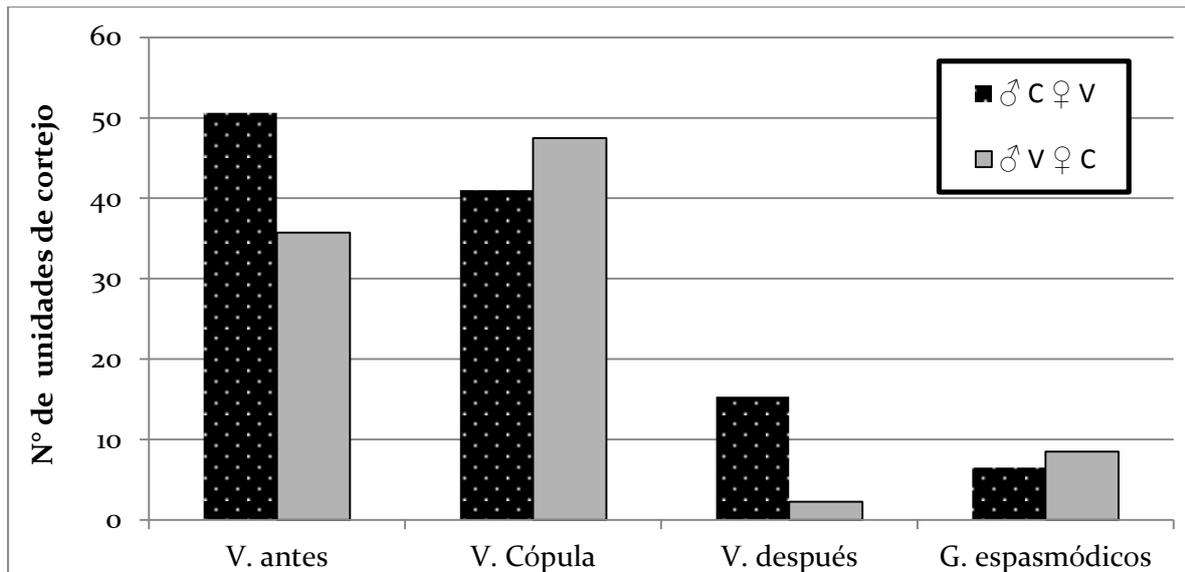


Figura 4. Número medio de unidades de cortejo que realizaron los machos de *P. longisternale* ante la presencia de hembras de diferente población. V= vibraciones.

Tabla 3. Medidas de hembras y machos de *P. longisternale* con su comparación estadística entre ambos grupos. Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar.

	♀ VENTANIA - ♀ CÓRDOBA			♂ VENTANIA - ♂ CÓRDOBA		
<b>Peso (gr)</b>	1,28 $\pm$ 0,53	1,25 $\pm$ 0,27	t= 0,125 p=0,902	0,84 $\pm$ 0,006	0,81 $\pm$ 0,04	t= 0,93 p=0,40
<b>Largo total (cm)</b>	2,29 $\pm$ 0,26	2,28 $\pm$ 0,15	t= 0,095 p=0,925	2,03 $\pm$ 0,12	2,01 $\pm$ 0,078	t= -0,278 p=0,79
<b>Largo cefalotóra x</b>	1,04 $\pm$ 0,34	1,02 $\pm$ 0,06	t= 0,313 p=0,76	0,93 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,04	t= -1,1147 p= 0,32
<b>Ancho cefalotóra x</b>	0,75 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,09	t= -1,29 p= 0,22	0,71 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,05	t= -1,1169 p= 0,32

#### 4.3. Interacciones sexuales complementarias en *Grammostola vachoni*

Se observaron cinco cópulas (50%), uno de los machos copuló dos veces y el otro copuló tres veces. De las hembras, dos copularon dos veces, una en una ocasión, una fue cortejada una sola vez y la última ninguno de los dos machos la cortejó. Los machos realizaron vibraciones corporales, palpaes, tamborileos y golpes

espasmódicos sobre la hembra. Tres hembras antes y/o después de la cópula realizaron contracciones corporales y solo tres se mostraron catalépticas luego del apareamiento. Datos de la cópula y unidades comportamentales se muestran en la tabla 4 y 5 respectivamente. Los machos de la población de Córdoba realizaron ante hembras de Ventania iguales unidades de cortejo que los machos de Ventania. Duraciones y unidades promedio fueron similares a las realizadas por machos de Ventania ante hembras de la misma población. Se encontró que los machos de Córdoba demoraron más tiempo en comenzar el cortejo que los machos de Ventania (latencia:  $z=-2,1226$ ;  $p< 0,05$ ) y cortejaron durante más tiempo ( $z= -2,269$ ;  $p<0,05$ ). Aunque el cortejo fue más extenso en promedio realizaron la misma cantidad de unidades comportamentales que los machos de Ventania ya que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los restantes parámetros.

Tabla 4. *Parámetros de la cópula de dos poblaciones de G. vachoni con machos de Córdoba y hembras de Ventania. Datos de medias  $\pm$  Desvió Estándar.*

		<b>DURACIONES (SEG.)</b>				
	N° inserciones	Latencia de cortejo	Cortejo del ♂	Cópula	Inserciones	Catalepsis
♂C♀V	6,3 $\pm$ 4,1	718,2 $\pm$ 569,1	603,3 $\pm$ 385,5	57 $\pm$ 28,4	11,4 $\pm$ 9,5	61,3 $\pm$ 80,9
♂V♀V	4,8 $\pm$ 3,5	246,1 $\pm$ 359,5	208,0 $\pm$ 198,6	87,4 $\pm$ 70,8	9,0 $\pm$ 5,6	92,3 $\pm$ 113,6

Tabla 5. *Unidades de cortejo de G. vachoni en copuladas entre dos Poblaciones con machos de Córdoba y hembras de Ventania. Datos de medias  $\pm$  Desvió Estándar.*

	<b>CORTEJO ♂</b>					<b>CORTEJO ♀</b>
	Golpes espasmódicos	Vibraciones	Palpares	Tamborileos	Golpes Seco	Contracciones
♂C♀V	19,5 $\pm$ 10,5	5 $\pm$ 4,6	5,8 $\pm$ 3,1	4 $\pm$ 2	3,5 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 5,9
♂V♀V	24,1 $\pm$ 22,4	5,4 $\pm$ 6,7	4,3 $\pm$ 2,9	8,4 $\pm$ 9,3	3,3 $\pm$ 6,4	19,0 $\pm$ 10,9

## 5. Discusión

A partir de este estudio se pudo observar que los machos de *A. centralis* de Ventania no diferenciarían entre tela de hembras de su misma población a tela de hembras de la población de Córdoba, pero los machos de Córdoba solo cortejaron sobre tela de hembras de su población. Las señales presentes en la tela de las arañas suele asumirse como especie-específica, aunque estudios demostraron que las feromonas presentes en la seda pueden estimular a machos de especies hermanas (Roberts & Uetz 2004). Dentro del grupo de las migalomorfas se ha observado confusión en tarántulas simpátricas y sincrónicas, donde machos cortejan y las hembras responden a individuos de otros géneros (Costa *et al.* 2013a; b). Por lo tanto, machos de una población que ya no corteja ante la presencia de tela de hembras de otra población, deben haber sufrido grandes cambios en sus preferencias. Diferencias en cortejo y asimetrías en la ocurrencia del mismo fue observado para *Aglaoctenus lagotis* (Lycosidae) (González *et al.* 2015), donde machos de una población ante presencia de la tela de diferentes poblaciones, mostraron preferencia por señales quimio-táctiles de hembras homo-típicas. Estudios de las características del hábitat de *A. centralis* y ensayos con la presencia de las hembras de *A. centralis*, donde la presencia de señales vibratorias podrían confirmar o no el inicio del aislamiento reproductivo serán necesarios en un futuro. Los machos de Ventania de *A. centralis* no mostraron discordancias en el cortejo realizado sobre la tela de las hembras de las dos poblaciones, sugiriendo que el aislamiento reproductivo en esta especie estaría en diferentes fases según la población. Además los patrones de cortejo y unidades comportamentales entre las dos poblaciones fueron similares, esto nos sugiere que

deriva génica no estaría sucediendo, pero más estudios sobre estas poblaciones deberían realizarse en un futuro.

En cuanto a las tarántulas *P. longisternale* y *G. vachoni*, no se observaron diferencias en su repertorio de cortejo. Así mismo machos de las dos poblaciones de *P. longisternale* comenzaron su cortejo luego del contacto con tela de hembras de otras poblaciones, las hembras se vieron atraídas por estos machos y luego del contacto el reconocimiento entre poblaciones fue positivo y los individuos copularon. Se puede esperar que exista una confusión en las señales que disparan el cortejo del macho, pero luego del contacto más señales confirmarían la especificidad, como ocurre en las tarántulas *Acanthoscurria suina* y *Eupalaestrus weijenberghi* (Costa *et al.* 2013a; b), en donde los machos cortejan, las hembras responden pero no hay cópulas entre las especies. Por lo que el reconocimiento entre las parejas luego del contacto nos demostraría que no existirían barreras etológicas en las poblaciones de *P. longisternale* y *G. vachoni*. Dentro del mascotismo es conocida la existencia de híbridos de tarántulas en cautiverio, donde especies diferentes llegan a copular y dejan descendencia (Schultz & Schultz 2009). También se registró la posible existencia de híbridos en la naturaleza (Longhorn 2014) pero esto último al ser probado con técnicas moleculares perdió validez (Mendoza & Francke 2017). En Uruguay, dos poblaciones de diferentes formas de una tarántula, separadas por barreras geográficas se reprodujeron bajo condiciones de laboratorio (Postiglioni & Costa 2006), pero luego del análisis con nuevas técnicas moleculares, estas “formas” pasaron a ser dos especies diferentes del género *Grammostola* (Montes de Oca *et al.* 2016). Por lo que se concluye que datos moleculares ayudarían a confirmar la hipótesis que ambas poblaciones de las tarántulas *P. longisternale* y *G. vachoni* corresponden a la misma especie.

Las poblaciones de Córdoba se encuentran en el sistema montañoso denominado Sierras Pampeanas, la elevación de las mismas se registró a partir del Cuaternario durante el ciclo orogénico de los Andes (Guereschi & Martino 2008; Von Gosen 1998). Por otro lado Ventania se considera una extensa cuenca Paleozoica desarrollada en el margen de Gondwana y que resultó deformado durante el Permo-Triásico para formar Gondwánides (Sellés-Martínez 2001). De acuerdo al análisis de la fauna de escorpiones, opiliones y arañas de los sistemas serranos de Córdoba, San Luis, Ventania y Tandilia, se propone el reconocimiento de un patrón generalizado de distribución denominado “peripampásico” (Maury 1973; Acosta 1989, 1993; Mattoni & Acosta 1997, Ferretti *et al.* 2012), el cual, se extendería también hasta el sur de Uruguay (Acosta 1993, Ringuelet 1961). Este patrón indicaría una antigua conexión de estas faunas, hoy en mayor parte fragmentadas durante los últimos 65 millones de años desde la tectónica del terciario (Ringuelet 1961; Acosta 1989, 1993; Mattoni & Acosta 1997; Crisci *et al.* 2001; Ferretti *et al.* 2012). La conexión entre las poblaciones de *P. longisternale*, *A. centralis* y *G. vachoni* data de millones de años, tiempo necesario para que condiciones ambientales y comportamentales hayan forzado a las especies a cambiar sus tácticas reproductivas y comenzar el aislamiento.

Estudios más profundos de las poblaciones serán de utilidad para entender las relaciones entre ellas. Los datos preliminares obtenidos por medio de este estudio también podrían resultar valiosos al realizar análisis más análisis de los comportamientos sexuales, así como moleculares y ecológicos para apoyar estos primeros resultados.

## Conclusiones Generales

A partir de los datos de la cría de las arañas en el laboratorio y de las colectas en el campo se aportaron conocimientos sobre la biología reproductiva de tres especies de arañas migalomorfas de la Argentina. El periodo reproductivo de *Plesiopelma longisternale* abarca los meses de marzo a julio con observación de ootecas desde julio a noviembre, durante estos meses las hembras almacenan el esperma para luego fertilizar sus huevos donde un lapso de tiempo donde tácticas de elección críptica femenina o competencia espermática pueden ocurrir. Los machos de *Grammostola vachoni* alcanzan la adultez principalmente durante el verano, luego del periodo reproductivo, por lo que pasan los meses del invierno en sus refugios para luego salir a buscar a las hembras a finales de la primavera. Las hembras de *Acanthogonatus centralis* presentan luego de más de un año y medio de vida, espermatecas bien formadas a partir del cuarto estadio y la mayor cantidad de mudas con espermatecas se produjo a principios del invierno, coincidiendo con el periodo reproductivo; los machos en el laboratorio surgieron de manera constante en el año luego de casi dos años de vida, pero en el campo solo se los observó durante el periodo comprendido entre los meses de abril a agosto.

Detalles del cortejo y cópula de las tres especies fueron comparados con las descripciones previas. *Plesiopelma longisternale* realizó vibraciones corporales antes, durante y luego de la cópula, presentando de esta manera cortejo copulatorio. Se actualizó el cortejo de *A. centralis*, donde se agregaron nuevas unidades de cortejo previo al contacto. Las hembras de *G. vachoni* respondieron ante el cortejo del macho con contracciones, donde se observó un intenso intercambio de señales vibratorias previo a las inserciones del macho.

Con respecto a los estudios de comunicación química se halló que entre machos y hembras de *A. centralis* y *P. longisternale* no intervienen señales químicas aéreas. En cuanto a la presencia de señales de reconocimiento de pareja en la tela de las hembras, se observó que los machos de ambas especies encuentran a la tela como medio disparador de su cortejo. Los machos de *A. centralis* además mostraron esfuerzos diferenciales en el cortejo hacia los tratamientos de tela de las hembras vírgenes más que hacia los de tela de las hembras copuladas, demostrando que los machos han desarrollado la capacidad de diferenciar entre ellas y que las hembras pueden advertir sobre estatus reproductivo y receptividad.

Con relación al estudio de la transferencia de espermatozoides en *A. centralis*, durante la cópula los machos transfieren solo una porción de la totalidad de espermatozoides que poseen siendo posibles futuras cópulas sin inducción espermática y los riesgos asociados que ellas tienen. No se encontró relación entre la duración de la cópula con la cantidad de espermatozoides almacenados por la hembra así como tampoco con el remanente en los bulbos de los machos. No obstante, los resultados confirmarían un mayor control interno por parte de la hembra en la cantidad de espermatozoides presente en sus espermatecas luego de una cópula, así como también una amplia comunicación de la pareja previa a la cópula y posterior a ella.

Por medio de este trabajo se pudo confirmar la existencia de dimorfismo sexual en el tamaño corporal en *G. vachoni*, *P. longisternale* y *A. centralis*, donde las hembras son más grandes que los machos. Además las hembras de *A. centralis* poseen mayor porcentaje de grasas e índice corporal que los machos, aunque se encontraron iguales porcentajes de musculatura en patas. Por último las hembras de *A. centralis* y *G.*

*vachoni*, no mostraron superior inmunidad que los machos frente a un agente extraño. Estas características concuerdan, en su mayoría, con el estilo de vida de estas especies.

Por último con respecto a las variaciones entre las poblaciones de las arañas estudias, se pudo observar que en cuanto a las tarántulas *P. longisternale* y *G. vachoni*, no se observaron diferencias en su repertorio de cortejo. En cambio *A. centralis* mostró un inicio de aislamiento reproductivo, que estaría en diferentes fases según la población. Igualmente estudios más profundos y con mayor cantidad de individuos serían necesarios para obtener mejor representación de las poblaciones. Además al incluir localidades intermedias se podría encontrar un continuo de comportamientos o cambios.

Los estudios realizados en estas arañas muestran que, pese a las dificultades que el grupo posee (por ejemplo sus largos ciclos de vida, maduración y obtención de hembras vírgenes), interesantes patrones y mecanismos están presentes y son posibles de estudiar, brindando características de un grupo basal que ayudaría a entender la evolución de un clado más grande.

Cada uno de los temas abordados durante esta tesis, puede ser puntapié para nuevas líneas de investigación dentro del grupo de las migalomorfas. Así como también puede apoyar estudios morfológicos y genéticos de las tres especies modelo, para definir y mejorar la taxonomía del grupo.

La presente tesis constituye un aporte significativo al conocimiento de la biología reproductiva de las arañas migalomorfas de la Argentina y del mundo, y demuestra que el catalogado de “grupo simple” quedó obsoleto.

## Referencias Bibliográficas

- ACOSTA, L.E. 1989: La fauna de escorpiones y opiliones (Arachnida) de la Provincia de Córdoba. *Phd Thesis. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.*
- ACOSTA, L.E. 1993: Escorpiones y opiliones de la provincia de Córdoba: diversidad y zoogeografía. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **116**: 11–17.
- AHTIAINEN, J.J., R. V. ALATALO, R. KORTET & M.J. RANTALA 2005: A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 985–991.
- AISENBERG, A., L. BARUFFALDI & M. GONZÁLEZ 2010: Behavioural evidence of male volatile pheromones in the sex-role reversed wolf spiders *Allocosa brasiliensis* and *Allocosa alticeps*. *Naturwissenschaften* **97**: 63–70.
- AISENBERG, A. & F.G. COSTA 2005: Females Mated without Sperm Transfer Maintain High Sexual Receptivity in the Wolf Spider *Schizocosa malitiosa*. *Ethology* **111**: 545–558.
- AISENBERG, A. & F.G. COSTA 2008: Reproductive isolation and sex-role reversal in two sympatric sand-dwelling wolf spiders of the genus *Allocosa*. *Canadian Journal of Zoology* **86**: 648–658.
- AISENBERG, A. & W.G. EBERHARD 2009: Female cooperation in plug formation in a spider: Effects of male copulatory courtship. *Behavioral Ecology* **20**: 1236–1241.
- AISENBERG, A., M. GONZÁLEZ, Á. LABORDA, R. POSTIGLIONI & M. SIMÓ 2009: Reversed cannibalism, foraging, and surface activities of *Allocosa alticeps* and *Allocosa brasiliensis*: two wolf spiders from coastal sand dunes. *Journal of Arachnology* **37**: 135–138.
- AISENBERG, A. & A.V. PERETTI 2011: Sexual dimorphism in immune response, fat reserves and muscle mass in a sex role reversed spider. *Zoology* **114**: 272–275.

- ALBERTI, G. 2000: Chelicerata. In: *Reproductive Biology of Invertebrates*, Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.). John Wiley & Sons, Chichester pp. 311- 388.
- ALBERTI, G., B.A. AFZELIUS & S.M. LUCAS 1986: Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in bird spiders (Theraphosidae, Mygalomorphae, Araneae). *Journal of Submicroscopic* **18**: 739-753.
- ALBERTI G. & C. WEINMANN 1985: Fine structure of spermatozoa of some labidognath spiders (Filistatidae, Segestriidae, Dysderidae, Oonopidae, Scytodidae, Pholcidae; Araneae; Arachnida) with remarks on spermiogenesis. *Journal of Morphology* **185**: 1-35.
- ALBO, M.J., T. BILDE & G. UHL 2013: Sperm storage mediated by cryptic female choice for nuptial gifts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 1735.
- ALBO, M.J. & A.V. PERETTI 2015: Worthless and Nutritive Nuptial Gifts: Mating duration, sperm stored and potential female decisions in spiders. *Plos One* **10**: e0129453.
- ALBO, M.J., G. WINTHER, C. TUNI, S. TOFT & T. BILDE 2011: Worthless donations: male deception and female counter play in a nuptial gift-giving spider. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 329.
- AMÉZQUITA, A., A.P. LIMA, R. JEHLE, L. CASTELLANOS, Ó. RAMOS, A.J. CRAWFORD, H. GASSER & W. HÖDL 2009: Calls, colours, shape, and genes: A multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **98**: 826-838.
- ANDERSON, A.G. & E.A. HEBETS 2017: Increased insertion number leads to increased sperm transfer and fertilization success in a nursery web spider. *Animal Behaviour* **132**: 121-127.
- ANDERSON, J.T. & D.H. MORSE 2001: Pick-up lines: cues used by male crab spiders to find reproductive females. *Behavioral Ecology* **12**: 360-366.
- ANDERSSON, M. 1994: *Sexual Selection*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press pp. 599.
- ANDRÉS, J.A. & A. CORDERO RIVERA 2000: Copulation duration and fertilization success in a damselfly: An example of cryptic female choice? *Animal Behaviour* **59**: 695-703.

- ARCHER, M.S. & M.A. ELGAR 1999: Female preference for multiple partners: sperm competition in the hide beetle, *Dermestes maculatus* (DeGeer). *Animal Behaviour* **58**: 669–675.
- ARCHIBALD, K.E., L.J. MINTER, G.A. LEWBART & C.S. BAILEY 2014: Collection and characterization of semen from Chilean rose tarantulas (*Grammostola rosea*). *American Journal of Veterinary Research* **75**: 929–936.
- ARNQVIST, G. & T. NILSSON 2000: The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* **60**: 145–164.
- ARNQVIST, G. & L. ROWE 2013: *Sexual conflict*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- ASSIS, B.A. & M.W. FOELLMER 2016: One size fits all? Determinants of sperm transfer in a highly dimorphic orb-web spider. *Journal of Evolutionary Biology* **29**: 1106–1120.
- ASSIS, B.A., C. TRIETSCH & M.W. FOELLMER 2016: Male mate choice based on chemical cues in the cricket *Acheta domestica* (Orthoptera: Gryllidae). *Ecological Entomology* **42**: 11–17.
- ATKINSON, S.N. & M.A. RAMSAY 1995: The Effects of Prolonged Fasting of the Body Composition and Reproductive Success of Female Polar Bears (*Ursus maritimus*). *Functional Ecology* **9**: 559.
- AUSTAD, S.N. 1984: Evolution of sperm priority patterns in spiders. In: *Sperm competition and the evolution of mating systems*, R.L. Smith (Ed.). Harvard University Press, Cambridge Mass pp. 223–249.
- BAERG, W.J. 1928: The Life Cycle and Mating Habits of the male Tarantula. *The Quarterly review of biology* **3**: 109–116.
- BARLOW, G.W. 2002: How behavioural studies contribute to the species problem: a piscine perspective. *Fish and Fisheries* **3**: 197–212.
- BARUFFALDI, L. & M.C.B. ANDRADE 2015: Contact pheromones mediate male preference in black widow spiders: Avoidance of hungry sexual cannibals? *Animal Behaviour* **102**: 25–32.

- BARUFFALDI, L. & F.G. COSTA 2010: Changes in male sexual responses from silk cues of females at different reproductive states in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. *Journal of Ethology* **28**: 75–85.
- BARUFFALDI, L. & F.G. COSTA 2014: Male reproductive decision is constrained by sex pheromones produced by females. *Behaviour* **151**.
- BATEMAN, A.J. 1948: Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**: 349–368.
- BEREC, L., P.J. SCHEMBRI & D.S. BOUKAL 2005: Sex determination in *Bonellia viridis* (Echiura: Bonelliidae): population dynamics and evolution. *Oikos* **108**: 473–484.
- BERTANI, R., C.S. FUKUSHIMA & P.I. SILVA JÚNIOR 2008: Mating behavior of *Sickius longibulbi* (Araneae, Theraphosidae, Ischnocolinae), a spider that lacks spermathecae. *Journal of Arachnology* **36**: 331–335.
- BERTANI, R., P. ISMAEL & J. LABORATO 2002: The first Mygalomorph Spider without spermathecae: *Sickius longibulbi*, with a revalidation of *Sickius*. *Journal of Arachnology* **30**: 519–526.
- BERTKAU, P. 1877: Über die Übertragungsorgane und die Spermatozoen der Spinnen. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereines der Preussischen Rheinlande und Westphalens* **34**: 28–32.
- BIRKHEAD, T. & A. MØLLER 1998: *Sperm Competition and Sexual Selection*. New York.
- BIRKHEAD, T. & T. PIZZARI 2002: Postcopulatory sexual selection. *Nature reviews. Genetics* **3**: 262–273.
- BLEU, J., C. BESSA-GOMES & D. LALOI 2012: Evolution of female choosiness and mating frequency: Effects of mating cost, density and sex ratio. *Animal Behaviour* **83**: 131–136.
- BLUMSTEIN, D.T., C.S. EVANS & J.C. DANIEL 2000: JWatcher  
<http://galliform.psy.mq.edu.au/jwatcher/>.

- BOLLATTI, F., V.G. DIAZ, A.V. PERETTI & A. AISENBERG 2017: Geographical variation in sexual behavior and body traits in a sex role reversed wolf spider. *Naturwissenschaften* **104**: 40.
- BOND, J.E., M.C. HEDIN, M.G. RAMIREZ & B.D. OPELL 2001: Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology* **10**: 899–910.
- BOND, J.E., B.E. HENDRIXSON, C.A. HAMILTON & M. HEDIN 2012: A reconsideration of the classification of the Spider infraorder mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. *PLoS ONE* **7**: 6 e38753.
- BONDURIANSKY, R. 2001: The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews* **76**: 305–339.
- BRICEÑO, D., W.G. EBERHARD, J. VILARDI, J. CAYOL & T.E. SHELLY 2007: Courtship behavior of different wild strains of *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* **90**: 15–18.
- BUKOWSKI, T.C. & T.E. CHRISTENSON 1997: Determinants of sperm release and storage in a spiny orbweaving spider. *Animal Behaviour* **53**: 381–395.
- BUKOWSKI, T.C., C.D. LINN & T.E. CHRISTENSON 2001: Copulation and sperm release in *Gasteracantha cancriformis* (Araneae: Araneidae): differential male behaviour based on female mating history. *Animal Behaviour* **62**: 887–895.
- BURGER, M., M. IZQUIERDO & P. CARRERA 2010: Female genital morphology and mating behavior of *Orchestina* (Arachnida: Araneae: Oonopidae). *Zoology* **113**: 100–109.
- BYRNE, P.G. & W.R. RICE 2006: Evidence for adaptive male mate choice in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **273**: 917–922.

- CALBACHO-ROSA, L., I. GALICIA-MENDOZA, M.S. DUTTO, A. CÓRDOBA-AGUILAR & A.V. PERETTI 2013: Copulatory behavior in a pholcid spider: Males use specialized genitalic movements for sperm removal and copulatory courtship. *Naturwissenschaften* **100**.
- CALBACHO-ROSA, L., M.A. MORENO-GARCÍA, H. LANZ-MENDOZA, A.V. PERETTI & A. CÓRDOBA-AGUILAR 2012: Reproductive activities impair immunocompetence in *Physocyclus dugesi* (Araneae: Pholcidae). *Journal of Arachnology* **40**: 18–22.
- CALDERÓN, R., M. GARRIDO & C. PINTO 1990: Etapas del crecimiento de *Acanthogonatus franckii* Karsch, 1880 (Araneae: Nemesiidae). *Revista Chilena de Entomología*: 19–24.
- CANDOLIN, U. 2003: The use of multiple cues in mate choice. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**: 575–95.
- CAPOCASALE, R.M. & F. PEREZ-MILES 1990: Behavioural ecology of *Acanthogonatus tacuariensis* (Pérez & Capocasale) (Araneae, Nemesiidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **25**: 41–47.
- CEBALLOS, L., T.M. JONES & M.A. ELGAR 2015: Patterns of Sperm Transfer in the Golden Orb-Weaver *Nephila edulis*. *Ethology* **121**.
- CHAPMAN, T., G. ARNQVIST, J. BANGHAM & L. ROWE 2003: Sexual conflict. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 41–47.
- CHINTA, S.P., S. GOLLER, J. LUX, S. FUNKE, G. UHL & S. SCHULZ 2010: The sex pheromone of the wasp spider *Argiope bruennichi*. *Angewandte Chemie - International Edition* **49**: 2033–2036.
- CHOE, J.C. & B.J. CRESPI 1997: The evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids. In: *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*, J.C. Choe and B.J. Crespi (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–398.
- CLUTTON-BROCK, T. 2007: Sexual Selection in Males and Females. *Science* **318**: 1882–1885.
- CODDINGTON, J.A. 2005: Phylogeny and classification of spiders. *Spiders of North America: an identification manual*: 18–24.

- CODDINGTON, J.A., G. HORMIGA & N. SCHARFF 1997: Giant female or dwarf male spiders?  
*Nature* **385**: 687–688.
- COHN, J. 1990: Is It the Size That Counts? Palp Morphology, Sperm Storage, and Egg Hatching Frequency in *Nephila Clavipes* (Araneae, Araneidae). *Journal of Arachnology* **18**: 59–71.
- COPPERI, S., N. FERRETTI & G. POMPOZZI 2012: Can ' t you find me? Female sexual response in an Argentinean tarantula (Araneae, Theraphosidae). *Revista Colombiana de Entomología* **38**: 164–166.
- CÓRDOBA-AGUILAR, A., A. NAVA-SÁNCHEZ, D.M. GONZÁLEZ-TOKMAN, R. MUNGUÍA-STEYER & A.E. GUTIÉRREZ-CABRERA 2016: Immune Priming, Fat Reserves, Muscle Mass and Body Weight of the House Cricket is Affected by Diet Composition. *Neotropical Entomology* **45**: 404–410.
- COSTA-SCHMIDT, L.E., M.J. ALBO, F. BOLLATTI, F. CARGNELUTTI, L. CALBACHO-ROSA, S. COPPERI, N. FERRETTI, M. IZQUIERDO & A.V. PERETTI 2017: *Sexual Selection in Neotropical Spiders: Examples from Selected Groups*. In: *Behaviour and Ecology of Spiders, Contributions from the Neotropical Region*, Viera, C. & M.O. Gonzaga (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp 303-350 .
- COSTA, F.G., L. BARUFFALDI, C. PERAFÁN, C. PERDOMO, A. PANZERA, L. MONTES DE OCA & F. PÉREZ-MILES 2013:a: Confusion and isolation in the courtship of two sympatric and synchronic tarantula spiders (Mygalomorphae, Theraphosidae). *Bulletin of the British Arachnological Society* **16**: 106–109.
- COSTA, F.G., B. CURBELO & F. PÉREZ-MILES 2015: Long-term persistence and water resistance of female sex cues in the tarantula *Eupalaestrus weijenberghi* (Araneae: Theraphosidae). *Arachnology* **16**: 311–313.

- COSTA, F.G., L. MONTES DE OCA, C. PERDOMO, D. ORTIZ-VILLATORO, L. BARUFFALDI & F. PÉREZ-MILES 2013:b: Is more better? Sexual confusion during courtship between two sympatric and synchronic tarantulas: *Acanthoscurria suina* and *Eupalaestrus weijenberghi*. *Zoologia* **30**: 577–580.
- COSTA, F.G. & F. PÉREZ-MILES 1992: Notes on Mating and Reproductive Success of *Ceropelma Longisternalis* (Araneae , Theraphosidae ) in Captivity. *The Journal of Arachnology* **20**: 129–133.
- COSTA, F.G. & F. PÉREZ-MILES 1998: Behavior, life cycle and webs of *Mecicobothrium thorelli* (Araneae, Mygalomorphae, Mecicobothriidae). *Journal Of Arachnology* **26**: 317–329.
- COSTA, F.G. & F. PÉREZ-MILES 2002: Reproductive Biology of Uruguayan Theraphosids (Araneae, Mygalomorphae). *Journal of Arachnology* **30**: 571–587.
- COTTON, S., J. SMALL & A. POMIANKOWSKI 2006: Sexual Selection and Condition-Dependent Mate Preferences. *Current Biology* **16**: R755–R765.
- COYLE, F.A. & W.R. ICENOGLE 1994: Natural history of the Californian trapdoor spider genus *Aliatypus* (Araneae, Antrodiaetidae). *Journal of Arachnology* **22**: 225–255.
- COYLE, F.A. & W.A. SHEAR 1981: Observations on the natural history of *Sphodros abboti* and *Sphodros rufipes* (Araneae, Atypidae), with evidence for a contact sex pheromone. *Journal of Arachnology* **9**: 317–326.
- COYNE, J.A. & H.A. ORR 2004: *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 545.
- CREWS, S.C. & M. HEDIN 2006: Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: Homalonychus) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 470–487.
- CRISCI, J.V., S.E. FREIRE, G. SANCHO & L. KATINAS 2001: Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina). *Caldasia* **23**: 21–41.

- DARWIN C. 1859: *The Origin of Species*. The Modern Library, Random House. London.
- DARWIN C. 1871: *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. John Murray Pub., London.
- DAVIDOWITZ, G. 2008: Population and environmental effects on the size-fecundity relationship in a common grasshopper across an aridity gradient. *Journal of Orthoptera Research* **17**: 265–271.
- DECAE, A.E. 2005: Trapdoor spiders of the genus *Nemesia* Audouin, 1826 on Majorca and Ibiza: taxonomy, distribution and behaviour (Araneae, Mygalomorphae, Nemesiidae). *Bulletin of the British Arachnological Society* **13**: 145–168.
- DI RIENZO J.A., J. CASANOVES, M.G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA & C.W. ROBLEDO 2016: InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- DODSON, A.G.N., P.L. LANG, R.N. JONES & A.N. VERSPRILLE 2013: Specificity of attraction to floral chemistry in *Misumenoides formosipes* crab spiders. *The Journal of Arachnology* **41**: 36–42.
- DOR, A., S. MACHKOUR-M'RABET, L. LEGAL, T. WILLIAMS & Y. HÉNAUT 2008: Chemically mediated burrow recognition in the Mexican tarantula *Brachypelma vagans* female. *Naturwissenschaften* **95**: 1189–1193.
- EBERHARD, W.G. 1985: *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts pp. 244.
- EBERHARD, W.G. 1991: Copulatory courtship and cryptic female choice in insects. *Biological Review* **66**: 1–31.
- EBERHARD, W.G. 1996: *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press. Princeton N.Y. pp. 501.
- EBERHARD, W.G. 2004: Male-female conflict and genitalia: failure to confirm predictions in insects and spiders. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **79**: 121–186.

- EBERHARD, W.G. 2009:a: Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** : 10025–10032.
- EBERHARD, W.G. 2009:b: Static allometry and animal genitalia. *Evolution* **63**: 48–66.
- EBERHARD, W.G. & B.A. HUBER 1998: Courtship, copulation, and sperm transfer in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae) with implications for higher classification. *Journal of Arachnology* **26**: 342–368.
- EBERHARD, W.G. & B.A. HUBER 2010: Spider Genitalia. Precise Maneuvers with a Numb Structure in a Complex Lock. In: *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals*: J.L. Leonard & A. Córdoba-Aguilar (Eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K, pp. 249–284.
- EDWARD, D.A. & T. CHAPMAN 2011: The evolution and significance of male mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* **26**: 647–654.
- ELGAR, M.A. 1995: The duration of copulation in spiders: comparative patterns. *Records of the Western Australian Museum Supplement* **52**: 1–11.
- ELGAR, M.A. 1998: Sperm Competition and Sexual Selection in Spiders and Other Arachnids In: *Sperm Competition and Sexual Selection*, T.R. Birkhead & A.P. Møller (Eds.). Academic Press, London, pp. 307–339.
- ELGAR, M.A., M.J. BRUCE, F.E. CHAMPION DE CRESPIGNY, A.R. CUTLER, C.L. CUTLER, A.C. GASKETT, M.E. HERBERSTEIN, S. RAMAMURTHY & J.M. SCHNEIDER 2003: Male mate choice and patterns of paternity in the polyandrous, sexually cannibalistic orb-web spider *Nephila plumipes*. *Australian Journal of Zoology* **51**: 357–365.
- ELIAS, D.O., E.A. HEBETS & R.R. HOY 2006: Female preference for complex/novel signals in a spider. *Behavioral Ecology* **17**: 765–771.
- FAIRBAIRN, D.J. 2007: Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism. *BioScience* **58**: 460.

- FAIRBAIRN, D.J., W.U. BLANCKENHORN & T. SZÉKELY 2007: *Sex, size, and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford University Press.
- FERNÁNDEZ-MONTRAVETA, C. & M. CUADRADO 2013: *Hogna radiata* males do not deplete their sperm in a single mating. *Journal of Arachnology* **41**: 102–107.
- FERNÁNDEZ-MONTRAVETA, C. & J. MARUGÁN-LOBÓN 2017: Geometric morphometrics reveals sex-differential shape allometry in a spider. *PeerJ* **5**: e3617.
- FERRETTI, N., A. GONZÁLEZ & F. PÉREZ-MILES 2012:a: Historical biogeography of mygalomorph spiders from the peripampasic orogenic arc based on track analysis and PAE as a panbiogeographical tool. *Systematics and Biodiversity* **10**: 179–193.
- FERRETTI, N., A. GONZÁLEZ & F. PÉREZ-MILES 2014:a: Identification of priority areas for conservation in Argentina: quantitative biogeography insights from mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Journal of Insect Conservation* **18**: 1087–1096.
- FERRETTI, N., F. PÉREZ-MILES & A. GONZÁLES 2014:b: Historical relationships among Argentinean biogeographic provinces based on mygalomorph spider distribution data (Araneae: Mygalomorphae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **49**: 1–10.
- FERRETTI, N., G. POMPOZZI, S. COPPERI, A. GONZÁLEZ & F. PÉREZ-MILES 2013:a: Sexual behaviour of mygalomorph spiders: When simplicity becomes complex; an update of the last 21 years. *Bulletin of the British Arachnological Society* **16**: 85–93.
- FERRETTI, N., G. POMPOZZI, S. COPPERI, F. PÉREZ-MILES & A. GONZÁLEZ 2012:b: Mygalomorph Spider Community of a Natural Reserve in a Hilly System in Central Argentina. *Journal of Insect Science* **12**: 1–16.
- FERRETTI, N., G. POMPOZZI, S. COPPERI & L. SCHWERDT 2013:b: Aerial dispersal by *Actinopus* spiderlings (Araneae: Actinopodidae). *Journal of Arachnology* **41**: 407–408.

- FERRETTI, N., G. POMPOZZI, S. COPPERI, L. SCHWERDT, A. GONZÁLEZ & F. PÉREZ-MILES 2014:c: La comunidad de arañas Mygalomorphae (Araneae) de la Reserva Natural Sierra del Tigre, Tandilia, Buenos Aires, Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**: 308–314.
- FERRETTI, N., G. POMPOZZI & F. PÉREZ-MILES 2011: Sexual behavior of *Acanthogonatus centralis* (Araneae: Mygalomorphae: Nemesiidae) from Argentina, with some notes on their burrows. *Journal of Arachnology* **39**: 533–536.
- FERRETTI, N.E. & A.A. FERRERO 2008: Courtship and mating behavior of *Grammostola schulzei* (Schmidt 1994)(Araneae, Theraphosidae), a burrowing tarantula from Argentina. *Journal of Arachnology* **36**: 480–483.
- FISHER, R.F. 1930: *The Genetical theory of Natural Selection*. Oxford University Press, New York pp. 308.
- FOELIX, R. 2011: *Biology of Spider*. Oxford University Press, New York pp. 432.
- FOELLMER, M.W. & D.J. FAIRBAIRN 2005: Competing dwarf males: sexual selection in an orb-weaving spider. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 629–641.
- FOELLMER, M.W. & J. MOYA-LARAÑO 2007: Sexual size dimorphism in spiders: patterns and processes. In: *Sex, Size and Gender Roles*. Oxford University Press, pp. 71–82.
- FOSTER, S.A. & J.A. ENDLER 1999: *Geographic variation in behavior: perspectives on evolutionary mechanisms*. Oxford University Press pp. 336.
- FOX, C.W., R.C. STILLWELL, W.G. WALLIN & L.J. HITCHCOCK 2006: Temperature and host species affect nuptial gift size in a seed-feeding beetle. *Functional Ecology* **20**: 1003–1011.
- FUKUSHIMA, C.S., R. BERTANI & P.I. DA SILVA JUNIOR 2003: Feromônio sexual em aranhas migalomorfas? Actas IV Encontro de Aracnólogos do Cone Sul, São Pedro, Brazil: 201.
- GABEL, E. & G. UHL 2013: How to prepare spider sperm for quantification. *Arachnology* **16**: 109–112.

- GASKETT, A.C. 2007: Spider sex pheromones: Emission, reception, structures, and functions. *Biological Reviews* **82**: 27–48.
- GAVRILETS, S., G. ARNQVIST & U. FRIBERG 2001: The evolution of female mate choice by sexual conflict. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **268**: 531–539.
- GILLESPIE AND, J.P., M.R. KANOST & T. TRENCZEK 1997: Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**: 611–643.
- GOLOBOFF, P. 1995: A Revision of the South American Spiders of the Family Nemesiidae (Araneae, Mygalomorphae). Part I: Species from Peru, Chile, Argentina, and Uruguay. *Bulletin of the American Museum of Natural History*: 1–189.
- GONZÁLEZ, M., F.G. COSTA & A.V. PERETTI 2015: Funnel-web construction and estimated immune costs in *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Arachnology* **43**: 158–167.
- GONZÁLEZ, M., A.V. PERETTI & F.G. COSTA 2015: Reproductive isolation between two populations of *Aglaoctenus lagotis*, a funnel-web wolf spider. *Biological Journal of the Linnean Society* **114**: 646–658.
- GONZÁLEZ, M., A.V. PERETTI, C. VIERA & F.G. COSTA 2013: Differences in sexual behavior of two distant populations of the funnel-web wolf spider *Aglaoctenus lagotis*. *Journal of Ethology* **31**: 175–184.
- GREGORIČ, M., K. ŠUEN, R.-C. CHENG, S. KRALJ-FIŠER & M. KUNTNER 2016: Spider behaviors include oral sexual encounters. *Scientific Reports* **6**: 25128.
- GROSSI B. & M. CANALS 2015: Energetics, Scaling and Sexual Size Dimorphism of Spiders. *Acta Biotheoretica* **63**: 71–81.
- GROSSI, B., R. SOLIS, C. VELOSO & M. CANALS 2016: Consequences of sexual size dimorphism on energetics and locomotor performance of *Grammostola rosea* (Araneae; Theraphosidae). *Physiological Entomology* **41**: 281–288.

- GUERESCHI, A.B. & R.D. MARTINO 2008: Field and textural evidence of two migmatization events in the Sierras de Córdoba, Argentina. *Gondwana Research* **13**: 176–188.
- GUILFORD, T. & M.S. DAWKINS 1991: Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal Behaviour* **42**: 1–14.
- HAMMER, O., D.A.T. HARPER & P.D. RYAN. 2001: PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* **4**: 9.
- HARARI, A.R. & H. STEINITZ 2013: The evolution of female sex pheromones. *Current Zoology* **59**: 569–578.
- HARVEY, M.S. 2002: Short-range endemism among the Australian fauna: Some examples from non-marine environments. *Invertebrate Systematics* **16**: 555–570.
- HEAD, G. 1995: Selection on fecundity and variation in the degree of sexual size dimorphism among spider species (Class Araneae). *Evolution* **49**: 776–781.
- HEBETS, E.A. & D.R. PAPAJ 2005: Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **57**: 197–214.
- HEDRICK, A. V & E.J. TEMELES 1989: The evolution of sexual dimorphism in animals: Hypothesis and Tests. *Trends in Ecology & Evolution* **4**: 136–138.
- HÉNAUT, Y., S. MACHKOUR-M'RABET, H. WEISSENBERGER & R. ROJO 2015: Dimorphism and population size of the Mexican redrump tarantula, *Brachypelma vagans* (Araneae: Theraphosidae), in Southeast Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **86**: 737–743.
- HERBERSTEIN, M.E., J.M. SCHNEIDER, A.M.T. HARMER, A.C. GASKETT, K. ROBINSON, K. SHADDICK, D. SOETKAMP, P.D. WILSON, S. PEKÁR & M.A. ELGAR 2011:a: Sperm storage and copulation duration in a sexually cannibalistic spider. *Journal of Ethology* **29**: 9–15.
- HERBERSTEIN, M.E., J.M. SCHNEIDER, G. UHL & P. MICHALIK 2011:b: Sperm dynamics in spiders. *Behavioral Ecology* **22**: 692–695.

- HICKMAN, V.V. 1964: On *Atrax infensus* sp. n. (Araneida: Dipluridae) its habits and a method of trapping the males. *Papers and Proceedings of The Royal Society of Tasmania* **98**: 107-112.
- HOLWELL, G.I. 2008: Geographic variation in genital morphology of *Ciulfina* praying mantids. *Journal of Zoology* **276**: 108-114.
- HORMIGA, G., N. SCHARFF & J.A. CODDINGTON 2000: The phylogenetic basis of sexual size dimorphism in orb-weaving spiders (Araneae, Orbiculariae). *Systematic biology* **49**: 435-62.
- HOSKEN, D.J. & P. STOCKLEY 2003: Benefits of Polyandry: A Life History Perspective. *Evolutionary Biology*: 173-194.
- HUBER, B.A. 2005: Sexual selection research on spiders: progress and biases. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **80**: 363-385.
- HUBER, B.A. & W.G. EBERHARD 1997: Courtship, copulation, and genital mechanics in *Physocylus globosus* (Araneae, Pholcidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* **75**: 905-918.
- ISHIKAWA, M., S. MORI & Y. NAGATA 2006: Intraspecific differences in patterns of courtship behaviours between the Pacific Ocean and Japan sea forms of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology* **69**: 938-944.
- JACKSON, R.R. & S.D. POLLARD 1990: Intraspecific interactions and the function of courtship in mygalomorph spiders: a study of *Porrhothele antipodiana* (Araneae: Hexathelidae) and a literature review. *New Zealand Journal of Zoology* **17**: 499-526.
- JOHANSSON, B.G. & T.M. JONES 2007: The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews* **82**: 265-289.
- JUUSOLA, M. & A.S. FRENCH 1998: Adaptation properties of two types of sensory neurons in a spider mechanoreceptor organ. *Journal of Neurophysiology* **80**: 2781-4.

- KARLSON, P. & M. LUSCHER 1959: "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 55–56.
- KASTER, J.L. & E.M. JAKOB 1997: Last-male sperm priority in a haplogyne spider (Araneae: Pholcidae): Correlations between female morphology and patterns of sperm usage. *Annals of the Entomological Society of America* **90**: 254–259.
- KELSO, E.C. & P.A. VERRELL 2002: Do male veiled chameleons, *Chamaeleo calyptratus*, adjust their courtship displays in response to female reproductive status? *Ethology* **108**: 495–512.
- KRAMS, I., G.M. BURGHARDT, R. KRAMS, G. TRAKIMAS, A. KAASIK, S. LUOTO, M.J. RANTALA & T. KRAMA 2016: A dark cuticle allows higher investment in immunity, longevity and fecundity in a beetle upon a simulated parasite attack. *Oecologia* **182**: 99–109.
- KREBS, J.R. & N.B. DAVIES 1996: *An Introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell, Oxford Science.
- KUHN-NENTWIG, L. & W. NENTWIG 2013: The Immune System of Spiders. In: *Spider Ecophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 81–91.
- KUPFER, A. 2007: Sexual size dimorphism in amphibians: an overview. In: *Sex, Size and Gender Roles*. Oxford University Press, pp. 50–59.
- KUPFERNAGEL, S. & B. BAUR 2011: Partial precopulatory isolation between two geographically distant populations of the land snail *Arianta arbustorum* (L.). *Journal of Molluscan Studies* **77**: 87–94.
- KVARNEMO, C. & L.W. SIMMONS 2013: Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368**: 20120042.
- LANDE, R. 1980: Sexual dimorphism, Sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* **34**: 292–305.

- LANDE, R. 1981: Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 3721-3725.
- LEAVITT, D.H., J. STARRETT, M.F. WESTPHAL & M. HEDIN 2015: Multilocus sequence data reveal dozens of putative cryptic species in a radiation of endemic Californian mygalomorph spiders (Araneae, Mygalomorphae, Nemesiidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **91**: 56-67.
- LEONARD, A. & D. MORSE 2006: Line-following preferences of male crab spiders, *Misumena vatia*. *Animal Behaviour* **71**: 717-724.
- LINDENFORS, P., J.L. GITTLEMAN & K.E. JONES 2007: Sexual size dimorphism in mammals. In: *Sex, Size and Gender Roles*. Oxford University Press, pp. 16-26.
- LINN, C.D., Y. MOLINA, J. DIFATTA & T.E. CHRISTENSON 2007: The adaptive advantage of prolonged mating: a test of alternative hypotheses. *Animal Behaviour* **74**: 481-485.
- LONGHORN, S.J. 2014: On type localities of Mexican tarantulas, either missing for *Bonnetina*, or misleading for *Brachypelma*, with appeal for accurate biogeographic data. *British Tarantula Society Journal* **29**: 16-28.
- MACEDO, R.H. & G. MACHADO 2014: *Sexual Selection-Perspectives and models from the Neotropics*. Academic Press, pp. 441.
- MAIN, B.Y. 1978: Biology of the arid-adapted Australian trap door spider *Anidiops villosus* (rainbow). *Bulletin of the British Arachnological Society* **4**: 161-175.
- MARCOTTE, M., J. DELISLE & J.N. MCNEIL 2005: Impact of male mating history on the temporal sperm dynamics of *Choristoneura rosaceana* and *C. fumiferana* females. *Journal of Insect Physiology* **51**: 537-544.
- MARGRAF, A., C. COSTA-AYUB, M. OKADA, J. GOMES, C. ORTOLANI-MACHADO & M. SOARES 2011: Development of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae, Sicariidae) genital tract. *Brazilian Journal of Biology* **71**: 747-754.

- MARTIN, P. & P.P.G. BATESON 1993: *Measuring behaviour : an introductory guide*. Cambridge University Press, pp. 222.
- MAURY, E.A. 1973: Los escorpiones de los sistemas serranos de la provincia de Buenos Aires. *Physis* **32**: 351–371.
- MAYR, E. 194: *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press.
- MAYR, E. 1963: *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press.
- MCKEAN, K.A. & L. NUNNEY 2001: Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 7904–9.
- MENDOZA, J. & O. FRANCKE 2017: Systematic revision of *Brachypelma* red-kneed tarantulas (Araneae: Theraphosidae), and the use of DNA barcodes to assist in the identification and conservation of CITES-listed species. *Invertebrate Systematics* **31**: 157–179.
- MERILA, J. & E. SVENSSON 1997: Are Fat Reserves in Migratory Birds Affected by Condition in Early Life? *Journal of Avian Biology* **28**: 279.
- MICHALIK, P., M.R. GRAY & G. ALBERTI 2003: Ultrastructural observations of spermatozoa and spermiogenesis in *Wandella orana* Gray, 1994 (Araneae: Filistatidae) with notes on their phylogenetic implications. *Tissue and Cell* **35**: 325–337.
- MICHALIK, P., J. HAUPT & G. ALBERTI 2004: On the occurrence of coenospermia in mesothelid spiders (Araneae: Heptathelidae). *Arthropod Structure and Development* **33**: 173–181.
- MICHALIK, P. & E. LIPKE 2013: Male Reproductive System of Spiders. In: *Spider Ecophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 173–187.
- MICHALIK, P. & M.J. RAMÍREZ 2014: Evolutionary morphology of the male reproductive system, spermatozoa and seminal fluid of spiders (Araneae, Arachnida) - Current knowledge and future directions. *Arthropod Structure and Development* **43**: 291–322.

- MICHALIK, P., W. REIHER, M. TINTELNOT-SUHM, F.A. COYLE & G. ALBERTI 2005: Female genital system of the folding-trapdoor spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): Ultrastructural study of form and function with notes on reproductive biology of spiders. *Journal of Morphology* **263**: 284–309.
- MICHALIK, P. & G. UHL 2005: The male genital system of the cellar spider *Pholcus phalangoides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae, Araneae): Development of spermatozoa and seminal secretion. *Frontiers in Zoology* **2**: 1–12.
- MILLER, G., G. STRATTON, P. MILLER & E. HEBETS 1998: Geographical variation in male courtship behaviour and sexual isolation in wolf spiders of the genus *Schizocosa*. *Animal behaviour* **56**: 937–951.
- MINCH, E.W. 1977: the Molting Sequence in *Aphonopelma chalcodes* (Araneae : Theraphosidae). *Journal of Arachnology* **5**: 133–137.
- MIRANDA, A., M.T. MIRANDA, L. JOUVENSAL, F. VOVELLE, P. BULET & S. DAFFRE 2009: Gomesin, a powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Animal Toxins: State of the Art*: 323–343.
- MØLLER, A.P. & N. SAINO 1994: Parasites, immunology of hosts, and host sexual selection. *The Journal of Parasitology* **80**: 850–8.
- MONTES DE OCA, L., G. D'ELÍA & F. PÉREZ-MILES 2016: An integrative approach for species delimitation in the spider genus *Grammostola* (Theraphosidae, Mygalomorphae). *Zoologica Scripta* **45**: 322–333.
- MORISHITA, R. & S.A. FERREIRA 2003: Studies on Oogenesis and Oviposition in the Brown Spider *Loxosceles intermedia* (Araneae : Sicariidae ). *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **582**: 575–582.
- MORRONE, J.J. 2001: *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. Zaragoza: M&T Manuales & Tesis SEA.

- MORSE, D.H. 2010: Male mate choice and female response in relation to mating status and time since mating. *Behavioral Ecology* **21**: 250–256.
- MOYA-LARAÑO, J. 2002: Senescence and food limitation in a slowly ageing spider. *Functional Ecology* **16**: 734–741.
- MOYA-LARAÑO, J., J. HALAJ & D.H. WISE 2002: Climbing to reach females: Romeo should be small. *Evolution* **56**: 420–425.
- MOYA-LARAÑO, J., R. MACÍAS-ORDÓÑEZ, W.U. BLANCKENHORN & C. FERNÁNDEZ-MONTRAVETA 2008: Analysing body condition: mass, volume or density? *Journal of Animal Ecology* **77**: 1099–1108.
- MOYA-LARAÑO, J., J. PASCUAL & D.H. WISE 2003: Mating patterns in late-maturing female Mediterranean tarantulas may reflect the costs and benefits of sexual cannibalism. *Animal Behaviour* **66**: 469–476.
- NENTWIG, W. 2013: *Spider ecophysiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 529.
- OLIVERO, P.A., A. GONZÁLEZ, C.I. MATTONI & A.V. PERETTI 2015: Chemical caressess: geographical variation of male sexual signals in a Neotropical scorpion. *Behaviour* **152**: 1745–1763.
- OLIVERO, P.A., C.I. MATTONI & A.V. PERETTI 2017: Differences in mating behavior between two allopatric populations of a Neotropical scorpion. *Zoology* **123**: 71–78.
- PANHUIS, T.M., R. BUTLIN, M. ZUK & T. TREGENZA 2001: Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 364–371.
- PAPKE, M.D., S.E. RIECHERT & S. SCHULZ 2001: An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. *Animal Behaviour* **61**: 877–886.
- PARKER, G.A. 1970: Sperm Competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* **45**: 525–567.

- PERETTI, A.V. & A. AISENBERG 2011: Communication under sexual selection hypotheses: Challenging prospects for future studies under extreme sexual conflict. *Acta Ethologica* **14**: 109–116.
- PERETTI, A.V. & W.G. EBERHARD 2010: Cryptic female choice via sperm dumping favours male copulatory courtship in a spider. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 271–281.
- PÉREZ-MILES, F. 1989: Variación relativa de caracteres somáticos y genitales en *Grammostola mollicoma* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology* **17**: 263–274.
- PÉREZ-MILES, F. & R.M. CAPOCASALE 1982: Hallazgo de una tercera especie del genero *Pycnothelopsis*: *Pycnothelopsis tacuariensis* sp. nov. (Araneae, Pycnothelidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* **11**: 1–7.
- PÉREZ-MILES, F., F.G. COSTA, C. TOSCANO-GADEA & A. MIGNONE 2005: Ecology and behaviour of the ‘road tarantulas’ *Eupalaestrus weijenberghi* and *Acanthoscurria suina* (Araneae, Theraphosidae) from Uruguay. *Journal of Natural History* **39**: 483–498.
- PÉREZ-MILES, F., R. POSTIGLIONI, L. MONTES-DE-OCA, L. BARUFFALDI & F.G. COSTA 2007: Mating system in the tarantula spider *Eupalaestrus weijenberghi* (Thorell, 1894): Evidences of monandry and polygyny. *Zoology* **110**: 253–260.
- PIZZARI, T. & T.R. BIRKHEAD 2000: Female feral fowl eject sperm of subdominant males. *Nature* **405**: 787–789.
- PIZZARI, T. & N. WEDELL 2013: The polyandry revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**: 20120041.
- PLATNICK, N. 1971: The evolution of courtship behaviour in spiders. *Bulletin of the British Arachnological Society* **2**: 40–47.
- POLLARD, S., A. MACNAB & R. JACKSON 1987: Communication with chemicals: pheromones and spiders. *Ecophysiology of spiders*: 133–141.

- POSTIGLIONI, R. & F.G. COSTA 2006: Reproductive isolation among three populations of the genus *Grammostola* from Uruguay ( Araneae , Theraphosidae ). *Iheringia. Série Zoologia* **96**: 71–74.
- PRENTER, J., R.W. ELWOOD & W.I. MONTGOMERY 1999: Sexual size dimorphism and reproductive investment by Female Spiders: a comparative analysis. *Evolution* **53**: 1987–1994.
- QUIRICI, V. & F.G. COSTA 2005: Seismic Communication During Courtship in Two Burrowing Tarantula Spiders: an Experimental Study on *Eupalaestrus weijenberghi* and *Acanthoscurria suina*. *Journal of Arachnology* **33**: 159–166.
- QUIRICI, V. & F.G. COSTA 2007: Seismic Sexual Signal Design of Two Sympatric Burrowing Tarantula Spiders From Meadows of Uruguay: *Eupalaestrus weijenberghi* and *Acanthoscurria suina* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology* **35**: 38–45.
- RANTALA, M.J., I. JOKINEN, R. KORTET, A. VAINIKKA & J. SUHONEN 2002: Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **269**: 1681–1685.
- RANTALA, M.J., R. KORTET, J.S. KOTIAHO, A. VAINIKKA & J. SUHONEN 2003: Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology* **17**: 534–540.
- RAVEN, R.J. 1985: The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): cladistics and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **182**: 1–180.
- REISS, M.J. 1989: *The allometry of growth and reproduction*. Cambridge University Press pp. 186.
- RIECHERT, S.E. & F.D. SINGER 1995: Investigation of potential male mate choice in a monogamous spider. *Animal Behaviour* **49**: 715–723.

- RINGUELET, R.A. 1961: Rasgos fundamentales de la zoogeografía Argentina. *Physis* **22**: 151–170.
- ROBERTS, J.A. & G.W. UETZ 2004: Species-specificity of chemical signals: Silk source affects discrimination in a wolf spider (Araneae: Lycosidae). *Journal of Insect Behavior* **17**: 477–491.
- ROHLF, F.J. 2004: *tpsDig*: digitize landmarks and outlines, version 2.0. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- ROUSE, G.W., S.K. GOFFREDI & R.C. VRIJENHOEK 2004: Osedax: Bone-Eating Marine Worms with Dwarf Males. *Science* **305**: 668–671.
- ROWE, L. 1994: The costs of mating and mate choice in water striders. *Animal Behaviour* **48**: 1049–1056.
- RStudio Team. 2015: *RStudio*: Integrated Development for R. RStudio. <http://www.rstudio.com/>
- RYAN, M.J., R.B. COCROFT & W. WILCZYNSKI 1990: The role of environmental selection in intraspecific divergence of mate recognition signals in the cricket frog, *Acris crepitans*. *Evolution* **44**: 1869.
- SATO, N., M.A. YOSHIDA & T. KASUGAI 2017: Impact of cryptic female choice on insemination success: Larger sized and longer copulating male squid ejaculate more, but females influence insemination success by removing spermatangia. *Evolution* **71**: 111–120.
- SCHIAPELLI, R.D. & B. GERSCHMAN 1942: Arañas Argentinas (I parte). *Anales Museo Argentino Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* **40**: 317–332.
- SCHLUTER, D. 2000: *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press pp. 296.
- SCHNEIDER, C.A., W.S. RASBAND & K.W. ELICEIRI 2012: *NIH Image to ImageJ*: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**: 671–675.
- SCHNEIDER, J.M. & M.C.B. ANDRADE 2011: Mating behaviour and sexual selection. In: *Spider Behaviour: Flexibility and Versatility*, M.E Herberstein (Ed.). Cambridge University Press, New York, pp. 391.

- SCHNEIDER, J.M. & M.A. ELGAR 2001: Sexual cannibalism and sperm competition in the golden orb-web spider *Nephila plumipes* (Araneoidea): female and male perspectives. *Behavioral Ecology* **12**: 547–552.
- SCHNEIDER, J.M., M.E. HERBERSTEIN, F.C. DE CRESPIGNY, S. RAMAMURTHY & M.A. ELGAR 2000: Sperm competition and small size advantage for males of the golden orb-web spider *Nephila edulis*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 939–946.
- SCHNEIDER, J.M. & Y.I. LUBIN 1998: Intersexual conflict in spiders. *Oikos* **83**: 496–506.
- SCHULENBURG, H., J. KURTZ, Y. MORET & M.T. SIVA-JOTHY 2009: Introduction. Ecological immunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **364**: 3–14.
- SCHULTE, K.F., G. UHL & J.M. SCHNEIDER 2010: Mate choice in males with one-shot genitalia: Limited importance of female fecundity. *Animal Behaviour* **80**: 699–706.
- SCHULTZ, S.A. & M.J. SCHULTZ 2009: *The tarantula keeper's guide*. Barron's Educational Series, New York, pp. 384.
- SCHULZ, S. 2004: Semiochemistry of spiders. In: *Advances in Insect Chemical Ecology*, R. Cardé & J. Milla (Eds.). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 110–150.
- SCHULZ, S. 2013: Spider Pheromones, a Structural Perspective. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 1–14.
- SCHWERDT, L., A.E. DE VILLALOBOS & F. PÉREZ-MILES 2018: Spiders as potential bioindicators of mountain grasslands health: the Argentine tarantula *Grammostola vachoni* (Araneae, Theraphosidae). *Wildlife Research* **45**: 64–71.
- SELLÉS MARTÍNEZ, J. 2001: Geología de la Ventania (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Journal of Iberian Geology* **27**: 43–69.
- SENTENSKÁ, L. & S. PEKÁR 2014: Eat or not to eat: Reversed sexual cannibalism as a male foraging strategy in the spider *Micaria sociabilis* (Araneae: Gnaphosidae). *Ethology* **120**: 511–518.

- SHELDON, B.C. & S. VERHULST 1996: Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 317–321.
- SHILLINGTON, C. 2005: Inter-sexual differences in resting metabolic rates in the Texas tarantula, *Aphonopelma anax*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **142**: 439–445.
- SHILLINGTON, C. & C.C. PETERSON 2002: Energy metabolism of male and female tarantulas (*Aphonopelma anax*) during locomotion. *The Journal of experimental biology* **205**: 2909–2914.
- SHILLINGTON, C. & P. VERRELL 1997: Sexual strategies of a North American ‘tarantula’ (Araneae: Theraphosidae). *Ethology* **103**: 588–598.
- SHORTHOUSE, D.P. 2010: *SimpleMappr*: an online tool to produce publication-quality point maps. Retrieved from <http://www.simplemappr.net>.
- SIMMONS, L.W. 1988: The calling song of the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (de Geer): constraints on transmission and its role in intermale competition and female choice. *Animal Behaviour* **36**: 380–394.
- SIMMONS, L.W. 2001: The evolution of polyandry: An examination of the genetic incompatibility and good-sperm hypotheses. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 585–594.
- 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.
- SNOW, L.S.E. & M.C.B. ANDRADE 2004: Pattern of sperm transfer in redback spiders: Implications for sperm competition and male sacrifice. *Behavioral Ecology* **15**: 785–792.
- SOLENSKY, M.J. & K.S. OBERHAUSER 2009: Male monarch butterflies, *Danaus plexippus*, adjust ejaculates in response to intensity of sperm competition. *Animal Behaviour* **77**: 465–472.

- SOUZA-SILVA, M., I.G. SILVA & A.D. BRESCOVIT 2014: Bionomic aspects of *Prorachias bristowei* (Araneae: Mygalomorphae: Nemesiidae): burrow density and shape, food items, body size and reproduction. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **49**: 106–113.
- STEIGER, S. & J. STÖKL 2014: The role of sexual selection in the evolution of chemical signals in insects. *Insects* **5**: 423–438.
- STILLWELL, R.C., W.U. BLANCKENHORN, T. TEDER, G. DAVIDOWITZ & C.W. FOX 2010: Sex Differences in Phenotypic Plasticity Affect Variation in Sexual Size Dimorphism in Insects: From Physiology to Evolution. *Annual Review of Entomology* **55**: 227–245.
- STOLTEY, T. & C. SHILLINGTON 2009: Metabolic rates and movements of the male tarantula *Aphonopelma anax* during the mating season. *Canadian Journal of Zoology* **87**: 1210–1220.
- STOLTZ, J.A., J.N. MCNEIL & M.C.B. ANDRADE 2007: Males assess chemical signals to discriminate just-mated females from virgins in redback spiders. *Animal Behaviour* **74**: 1669–1674.
- SYMONDS, M.R.E. & M.A. ELGAR 2008: The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 220–228.
- TAYLOR, M.L., T.A.R. PRICE & N. WEDELL 2014: Polyandry in nature: A global analysis. *Trends in Ecology and Evolution* **29**: 376–383.
- THORNHILL, R. 1983: Cryptic Female Choice and Its Implications in the Scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist* **122**: 765–788.
- THORNHILL, R. & J. ALCOCK 1983: *The Evolution of insect mating systems*. Harvard University Press. Cambridge, pp. 547.
- THRALL, P.H., J. ANTONOVICS & A.P. DOBSON 2000: Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: prevalence and impact on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 1555–1563.
- TINBERGEN N. 1953. *Social behavior in animals, with special reference to vertebrates*. Methuen, Londres, pp. 150.

- TRABALON, M. 2011: Agonistic interactions, cuticular and hemolymphatic lipid variations during the foraging period in spider females *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae). *Journal of Insect Physiology* **57**: 735–743.
- TRABALON, M. & A.G. BAGNÈRES 2010: Contact recognition pheromones in spiders and scorpions. In: *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology*. G.J. Blomquist (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 344–374.
- TRABALON, M., J. NIOGRET & C. LEGRAND-FROSSI 2005: Effect of 20-hydroxyecdysone on cannibalism, sexual behavior, and contact sex pheromone in the solitary female spider, *Tegenaria atrica*. *General and Comparative Endocrinology* **144**: 60–66.
- TRIVERS, R.L. 1972: Parental investment and sexual selection. In: *Sexual Selection and the Descent of Man 1871-1971*, B. Campbell (Ed.). Aldine, Chicago, pp. 136–179.
- TUNI, C. & R. BERGER-TAL 2012: Male preference and female cues: Males assess female sexual maturity and mating status in a web-building spider. *Behavioral Ecology* **23**: 582–587.
- TURNELL, B.R. & K.L. SHAW 2015: High opportunity for postcopulatory sexual selection under field conditions. *Evolution* **69**: 2094–2104.
- UHL, G. 2000: Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). *Proceedings of the 19th European Colloquium of Arachnology*: 145–156.
- UHL, G., K. KUNZ, O. VÖCKING & E. LIPKE 2014: A spider mating plug: Origin and constraints of production. *Biological Journal of the Linnean Society* **113**: 345–354.
- VERRELL, P. & M. MABRY 2003: Sexual behaviour of the Black Mountain dusky salamander (*Desmognathus welteri*), and the evolutionary history of courtship in the Desmognathinae. *Journal of Zoology* **260**: 367–376.
- VIRANT-DOBERLET, M. & A. COKL 2004: Vibrational communication in insects. *Neotropical Entomology* **33**: 121–134.
- VOLLRATH, F. & G.A. PARKER 1992: Sexual dimorphism and distorted sex ratios in spiders. *Nature* **360**: 156–159.

- VON GOSEN, W. 1998: Transpressive deformation in the southwestern part of the Sierra de San Luis (Sierras Pampeanas, Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* **11**: 233-264.
- WALSH, R.E. & L.S. RAYOR 2008: Kin discrimination in the amblypygid, *Damon diadema*. *Journal of Arachnology* **36**: 336-343.
- WEDELL, N., M.J.G. GAGE & G.A. PARKER 2002: Sperm competition, male prudence and sperm limited females. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 313-320.
- WIERNASZ, D.C., A.K. SATER, A.J. ABELL & B.J. COLE 2001: Male size, sperm transfer, and colony fitness in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Evolution* **55**: 324-329.
- WIGNALL, A.E. & M.E. HERBERSTEIN 2013: The influence of vibratory courtship on female mating behaviour in orb-web spiders (*Argiope keyserlingi*, Karsch 1878). *PLoS ONE* **8**.
- WILLIAMS, G.C. 1975: *Sex and evolution*. Princeton University Press pp. 210.
- WONG, M.K.L., J.D. WOODMAN & D.M. ROWELL 2017: Short-range phenotypic divergence among genetically distinct parapatric populations of an Australian funnel-web spider. *Ecology and Evolution*: 1-9.
- WORLD SPIDER CATALOG 2018: *World Spider Catalog*. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>.
- WYATT, T.D. 2003: *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by smell and taste*. Cambridge University Press, Cambridge pp. 391.
- XIAO, Y., J. ZHANG & S. LI 2009: A two-component female-produced pheromone of the spider *Pholcus beijingensis*. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 769-778.
- YAMASHITA, T. & G.A. POLIS 1995: Geographical analysis of scorpion populations on habitat islands. *Heredity* **75**: 495-505.
- YÁNEZ, M., A. LOCHT & R. MACÍAS-ORDÓÑEZ 1999: Courtship and mating behavior of *Brachypelma klaasi* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology* **27**: 165-170.

ZAHAVI, A. 1975: Mate selection-A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**: 205-214.

ZUK, M. & K.A. MCKEAN 1996: Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International Journal for Parasitology* **26**: 1009-1023.

ZUK, M. & A.M. STOEHR 2002: Immune Defense and Host Life History. *The American Naturalist* **160**: 9-22.