

**VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA EN
POBLACIONES URUGUAYAS DE LA ARAÑA CON
REGALO NUPCIAL *Paratrechalea ornata***

Mariana Germil Núñez

Orientadora: Dra. Ivanna Tomasco

Co-orientadora: Dra. María José Albo

Tesina de grado en Ciencias Biológicas

Tribunal:

Dr. Arley Camargo

Mag. Natalia Mannise

Dr. Diego Castillo

Uruguay, 2021

Agradecimientos

Este trabajo representa la etapa final de todo un largo proceso que para mí ha sido de pura transformación en muchos niveles y escalas. Cada persona que encontré en el camino y cada decisión tomada me llevaron a vivir experiencias llenas de aprendizajes. Por esto estaré siempre agradecida

Les agradezco enormemente a María José y a Ivanna por ser orientadoras excepcionales. Por enseñarme tanto, por motivarme siempre y ayudarme a volver al camino cuando estuve un poco perdida. Por ser maravillosas personas y ejemplos de vida. Gracias por todas las risas compartidas, las salidas de campo, y también por los momentos de crisis y caos. Feliz de haberlas conocido. Gracias Majó por esas charlas de reflexión tan necesarias en el mundo de la ciencia y por esa constante dedicación a fortalecer el grupo de trabajo a través del respeto y la comunicación. Gracias a Mauro y Camila, que forman parte de ese grupo y fueron grandes compañeros de aventuras en el campo y en el laboratorio.

Agradezco al Dr. Adalberto Santos de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil por compartir parte de los datos moleculares y a la Mag. Irene Pandulli-Alonso por el trabajo en conjunto durante la optimización de los microsátélites utilizados. A los gestores y guardaparques del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), en especial a Daniel Erman que nos apoyó y compartió su conocimiento sobre la Quebrada de los Cuervos. A las Intendencias de Treinta y Tres, Rivera, Lavalleja y Paysandú por su apoyo logístico para realizar las salidas de campo.



Intendencia
Departamental
de Rivera



Paysandú
INTENDENCIA DEPARTAMENTAL

Agradezco también a Natalia Mannise, Arley Camargo y Diego Castillo por aceptar ser parte de mi tribunal en comienzos de la locura de fin de año.

Terminar este ciclo no ha sido fácil, y hubiera sido mucho más difícil aun sin algunas personas que no quiero dejar de agradecer. A toda mi familia, pero principalmente a mi madre, mi padre y mi hermana, con los que conviví durante todo este proceso. Gracias por siempre estar ahí para mí. Sin su amor y apoyo no sería quien soy hoy. Gracias también a todas mis amigas y amigos; hermanas y hermanos que me fui encontrando por ahí en la vida. Gracias por hacer más divertidos los momentos difíciles de este largo viaje que elegí. Me agradezco por esa elección y no lo habría hecho diferente, sin dudas crecí un montón.

Gracias, gracias a todos. Me llevo lo vivido guardado en el corazón.



Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
Materiales y métodos.....	5
Estudios morfológicos.....	5
Estudios genéticos.....	6
Resultados.....	8
Estudios morfológicos.....	8
Estudios genéticos.....	9
Discusión.....	12
Perspectivas.....	17
Bibliografía.....	19
Anexo.....	26

Resumen

La evolución adaptativa de determinados rasgos de las especies está vinculada con las condiciones locales de cada ambiente, lo que se refleja en diferencias acumuladas a nivel genético, morfológico y comportamental. Los ambientes riparios son conocidos por ser fluctuantes y estresantes para los organismos que allí viven, lo que favorece la selección de aquellos individuos con rasgos flexibles que les permitan sobrevivir y reproducirse en mayor medida en condiciones cambiantes. *Paratrechalea ornata*, es una especie de araña neotropical semiacuática que vive asociada a ríos y arroyos. Los machos de esta especie ofrecen regalos nupciales envueltos en seda a las hembras durante el cortejo. Se conoce que el contenido del regalo puede variar dependiendo de la disponibilidad de presas, siendo en ocasiones presas (regalos nutritivos) y otras veces restos de las mismas o partes vegetales (regalos simbólicos). Estudios preliminares muestran diferencias significativas entre poblaciones en el porcentaje de regalos simbólicos ofrecidos (cuya frecuencia varía entre 45-96%) y en el tamaño de los individuos que componen cada una de ellas. En esta tesina se evaluaron las diferencias morfológicas y genéticas en cuatro poblaciones de la especie en Uruguay (Valle del Lunarejo, Minas, Quebrada de los Cuervos y Queguay) y se interpretaron los resultados desde un punto de vista ecológico y biogeográfico. Para evaluar el grado de diferenciación morfológica se utilizó como aproximación del tamaño corporal el ancho del cefalotórax. Para estimar la variabilidad genética se utilizó la variación en cuatro loci de STRs (por sus siglas en inglés: *Short Tandem Repeats*) y un gen mitocondrial (citocromo oxidasa I). Se encontró diferenciación significativa tanto a nivel molecular como morfológico entre poblaciones. En particular, los resultados moleculares muestran que Quebrada de los Cuervos seguida por Lunarejo son las poblaciones más diferenciadas. Las diferencias genéticas encontradas reflejarían un aislamiento geográfico, posiblemente debido a que las poblaciones se encuentran en diferentes cuencas hidrográficas. Además, esto facilitaría un proceso de diferenciación adaptativo morfológico y comportamental en respuesta a las distintas presiones selectivas generadas por factores ambientales locales, como la variación climática, la disponibilidad de presas y las dinámicas de cursos de agua propios de cada cuenca.

Introducción

Los cambios espaciales y temporales en las fuerzas selectivas sufridos por las poblaciones crean múltiples escenarios que pueden acelerar o no la adaptación de los organismos a nuevos ambientes^{1,2}. Es así que las distintas poblaciones de la misma especie pueden desarrollar diferencialmente rasgos beneficiosos que incrementen su éxito bajo las condiciones ambientales locales^{3,4}. Estas variaciones pueden estar asociadas a rasgos morfológicos, fisiológicos, comportamentales, entre otros^{5,6,7}. Diversos factores son potencialmente promotores de la diferenciación entre las poblaciones⁸ y eventualmente su especiación⁹. Se pueden distinguir al menos tres procesos por los cuales las poblaciones pueden diferenciarse en sus rasgos fenotípicos: adaptación local, azar y plasticidad fenotípica. En los procesos de adaptación local están involucrados tanto los factores ambientales como las dinámicas poblacionales y fuerzas evolutivas tales como la dispersión, el flujo génico, la selección natural divergente y la deriva genética⁸. Esta última tiene un papel importante en la diferenciación de las poblaciones, particularmente cuando estas son pequeñas y el flujo de genes entre ellas es bajo¹⁰. Es así que poblaciones más aisladas pueden pasar por un cuello de botella disminuyendo su tamaño y a su vez diferenciándose genéticamente¹¹, pudiendo eventualmente especiar.

Las diferencias acumuladas en diferentes ambientes se reflejan tanto a nivel genético como a nivel morfológico de los individuos^{11,12,13}. La producción de múltiples fenotipos por un determinado genotipo en respuesta a la variación ambiental, permite que los individuos puedan ampliar sus nichos ecológicos y así facilitar el cambio evolutivo al generar fenotipos que abarcan a los favorecidos por la selección (plasticidad fenotípica)¹⁴. Las variaciones en los rasgos son particularmente afectadas en aquellas especies que viven asociadas a ambientes fluctuantes en donde junto con los ciclos estacionales predecibles existe también variación estocástica^{15,16}. Este tipo de ambiente favorece la evolución de rasgos flexibles ya que exponen a los individuos a un rango amplio de condiciones¹⁷. Este es el caso de las arañas que viven asociadas a cursos de agua como ríos y arroyos^{18,19}. Se conoce que las arañas en ambientes riparios se alimentan mayoritariamente de insectos acuáticos que emergen del agua^{20,21} cuya disponibilidad puede variar de forma importante en el tiempo, principalmente durante periodos de inundaciones^{16,22}. Bajo tales condiciones inestables, la selección natural favorecerá los rasgos que maximicen el éxito de supervivencia y reproducción de los individuos en ese ambiente, como se ha observado en otros organismos^{23, 24, 25}.

Varias especies de arañas donadoras de regalos nupciales en donde los machos ofrecen materiales (más allá de los gametos) a las hembras durante el cortejo^{26, 27} viven en hábitats riparios. Estas especies se encuentran entonces bajo fuertes presiones selectivas a la hora de obtener recursos alimenticios para la supervivencia^{28,29}, mientras que además

necesitan disponer de estos para la producción de regalos. Esto es particularmente cierto para la especie neotropical *Paratrechalea ornata*³⁰ (Trechaleidae Mello-Leitao, 1943) donde se ha encontrado variación del comportamiento reproductivo entre distintas poblaciones³¹, mientras que datos preliminares sugieren además una aparente diferencia morfológica de tamaño entre poblaciones (Albo MJ, observaciones personales). Aunque en algunos casos copulan sin regalo nupcial, los machos de esta especie usualmente ofrecen regalos envueltos en seda a las hembras durante el cortejo, que pueden ser nutritivos (presas) o simbólicos (restos de presa o partes vegetales)^{32,33}. En Uruguay se conocen cuatro poblaciones: Lunarejo, Minas, Quebrada de los Cuervos (de aquí en adelante Quebrada) y Queguay (Fig. 1).

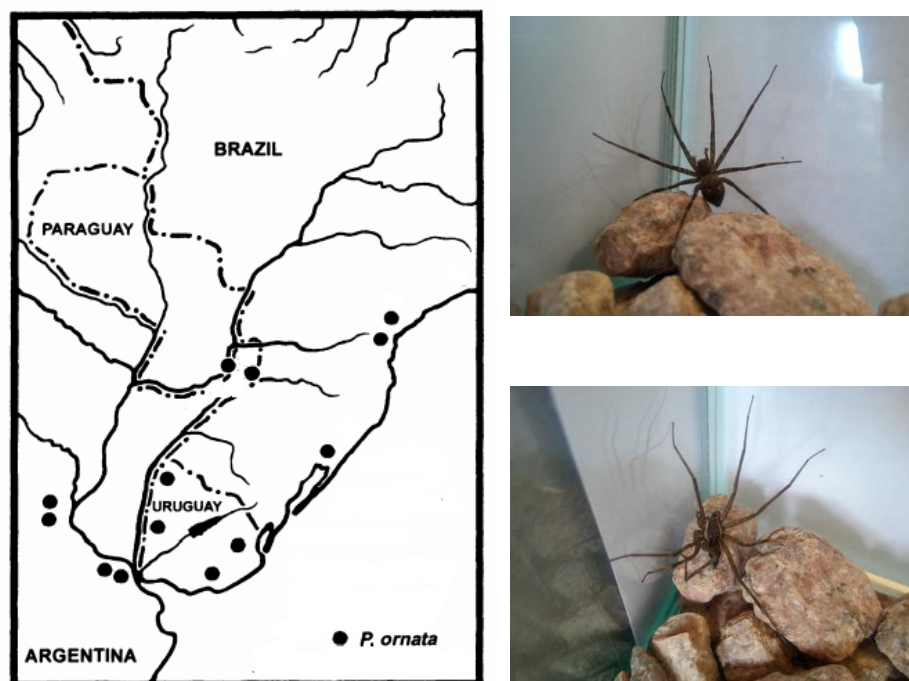


Figura 1- Mapa de distribución de *P. ornata* (izquierda) tomado de Carico (2005). Fotos de 2 individuos de la especie (derecha): una hembra arriba y un macho abajo. Foto: C. Pavón Peláez

Estos sitios se encuentran distanciados geográficamente por más de 100 km y pertenecen a cuencas hidrográficas diferentes (Fig. 2; Tabla A1- Anexo.). A excepción de la Quebrada, las demás poblaciones han sido previamente estudiadas. Dichos trabajos indican diferencias significativas en la proporción de regalos simbólicos en relación a los nutritivos, que varían entre 45-96%³⁴⁻³⁶. Se ha sugerido que esto depende de la variación en las condiciones climáticas y la predictibilidad del ambiente³¹. Minas tiene la menor proporción de regalos simbólicos y las menores variaciones anuales en el rango de temperatura y precipitación. Mientras que Queguay posee la mayor proporción de regalos simbólicos, y las más altas variaciones en el rango de temperatura y precipitación anual (Tabla 1). Dado que

Queguay es el ambiente con mayores fluctuaciones climáticas, es esperable que sea más impredecible y estresante para los individuos.

Tabla 1 – Valores de proporción de regalos simbólicos (%), variación en el rango de temperatura y por último coeficientes de variación de lluvia anual, para cada una de las cuatro poblaciones de estudio la araña *P. ornata*: Lunajero (Rivera), Minas (Lavalleja), Quebrada (Treinta y Tres) y Queguay (Paysandú).

Población	%Regalo simbólico	Temp. media anual	Precipitaciones (cv)
Queguay	96	12.4	19.5
Lunarejo	66	12.4	14.8
Minas	47	10.9	10.1
Quebrada	Sin estimar	11.1	15.0



Figura 2 – Mapa de Uruguay con las localidades de las cuatro poblaciones de la araña *P. ornata* en Uruguay; Lunajero (Rivera), Minas (Lavalleja), Quebrada (Treinta y tres) y Queguay (Paysandú), Uruguay. Con diferentes sombreados se muestran las cuencas hidrográficas para el país incluidas en las referencias.

En este proyecto se evaluaron las diferencias morfológicas y genéticas entre las cuatro poblaciones, y se interpretaron los resultados desde un punto de vista ecológico y biogeográfico. Dado que *P. ornata* es una especie semiacuática, asociada a ríos y arroyos, se cree que su dispersión sucede a través de las corrientes de agua y que las poblaciones

estarían conectadas por los mismos, lo que permite la potencial existencia de flujo génico entre éstas. Sin embargo, como estas poblaciones pertenecen a diferentes cuencas hidrográficas, nuestra hipótesis es que se encuentran aisladas geográficamente. Debido a esto esperamos que las presiones selectivas diferenciales más los procesos de deriva genética asociados al aislamiento geográfico, hayan permitido acumular diferencias genéticas en las poblaciones. Si esto se cumple, y dado las diferencias tan marcadas en las condiciones ambientales, nuestra segunda hipótesis es que la selección natural en aislamiento y localmente ha favorecido determinados morfologías y/o comportamientos en cada población. En ese caso, podríamos encontrar una asociación entre las características seleccionadas localmente, como podría ser el tamaño corporal y la diferenciación genética de cada población.

Objetivo general

Examinar el grado de variación genética y morfológica de la especie *P. ornata* de las cuatro poblaciones uruguayas.

Objetivos específicos

- 1- Estudiar el grado de variación morfológica de los individuos de las cuatro poblaciones mediante el análisis de su tamaño corporal.
- 2- Analizar el grado de diferenciación genética existente entre las cuatro poblaciones a través de marcadores moleculares: cuatro STRs (por sus siglas en inglés: *Short Tandem Repeats*) y un gen mitocondrial (citocromo oxidasa I).

Materiales y Métodos

Paratrechalea ornata posee una distribución limitada entre el sur de Brasil y el sur de Uruguay (Fig. 1). Posee actividad crepuscular nocturna y se alimenta principalmente de los insectos que emergen de los ríos y arroyos (efímeras)³⁷. En Uruguay se ha visto que tiene 2 períodos reproductivos (Marzo-Junio y Setiembre-Diciembre) y estudios previos muestran ausencia de diferencias en el tamaño corporal entre machos y hembras adultos de distintas poblaciones de *P. ornata*^{38,39}.

Con el objetivo de describir la variación morfológica y genética de la especie *P. ornata*, se utilizaron individuos de cada una de las poblaciones conocidas, conservados en etanol 75% en la colección de la Dra. Albo, colectados entre 2011 y 2018. Se evaluaron 123 individuos procedentes de cuatro localidades a lo largo del país: Valle del Lunarejo, Rivera (31.1906 S, 55.9010 W), Minas, Lavelleja (34.2776 S, 55.2336 W), Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres (32.9252 S, 54.4595 W) y Queguay, Paysandú (32.1781 S, 57.2376 W) (Fig. 1). Los análisis moleculares se realizaron con un subconjunto de datos.

Estudios morfológicos

Se examinaron bajo lupa binocular 80 individuos (20 de cada una de las cuatro poblaciones) y se utilizó el ancho del cefalotórax como medida del tamaño corporal⁴⁰. Debido a la ausencia de dimorfismo sexual³⁷, para este estudio solamente se utilizaron machos, siendo que las diferencias de tamaño corporal en este sexo podrían estar asociadas a la producción del regalo nupcial³⁹. Se utilizó el programa R (R versión 3.6.3)⁴¹ para los análisis estadísticos. Se verificó que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza mediante el test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se analizaron las diferencias de los tamaños corporales entre las cuatro poblaciones mediante el test ANOVA (Paquete *nlme*) y se evaluó la diferencia entre pares de poblaciones mediante el test a posteriori de Tukey (Paquete *multcomp*).

Estudios genéticos

1- Microsatélites -STRs

Se analizaron un total de 43 individuos. El trabajo de laboratorio molecular se realizó para 5 individuos por población, y se añadió la información previamente obtenida por Pandulli-Alonso *et al.*⁴² (8 individuos para la población de Minas y 5 para las demás), completando un total de 10 individuos por población y 13 en el caso de Minas. Se realizaron extracciones de ADN total a partir de patas de individuos adultos según protocolo modificado⁴³ y se cuantificó la concentración ADN de las extracciones en un espectrofotómetro (NANADROP LITE Spectrophotometer, Thermo Scientific). Se amplificaron por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuatro loci de STRs (B2, B3, C1, D4) ya diseñados para una especie del género *Paratrechalea*⁴⁴ (Tabla A2- Anexo). Todos los primers se marcaron con fluorocromos (HEX/FAM). Se utilizaron las condiciones de la reacción y ciclado previamente optimizadas para *P. ornata*⁴². Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% (29:1 acrilamida: bisacrilamida) durante 20 minutos a 170V para luego visualizarse mediante tinción con nitrato de plata⁴⁵. El tamaño de los productos de PCR se estimó por comparación con un marcador de peso molecular conocido de 100bp (RAINBOW, Bioron). Las amplificaciones exitosas fueron enviadas al servicio de Análisis de fragmentos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo (un ABI3500 Genetic Analyzer, con la matriz DS-33 y con Liz600 como estándar de tamaño).

Los archivos resultantes de las corridas se analizaron con el programa PeakScannerv2 (Applied Biosystem), anotando para cada muestra el tamaño absoluto de los alelos encontrados para cada loci. Mediante la utilización del programa GenePop⁴⁶ se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y esperadas, se evaluó si existen apartamientos significativos del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), se analizó la presencia

de alelos nulos, y también se examinó el desequilibrio de ligamiento entre loci. Con el mismo programa se evaluó la diferenciación poblacional global y entre pares de poblaciones para las frecuencias génicas y genotípicas, mediante el Exact test⁴⁷. Con el paquete estadístico PAST 5.1⁴⁸ se realizó un test de Mantel para examinar la presencia de un patrón de aislamiento por distancia, es decir si existe una correlación entre la matriz del logaritmo de las distancias geográficas (estimadas por Google maps) y distancias genéticas (Fst entre pares de poblaciones estimadas en el Genpop) para todos los pares de poblaciones⁴⁹.

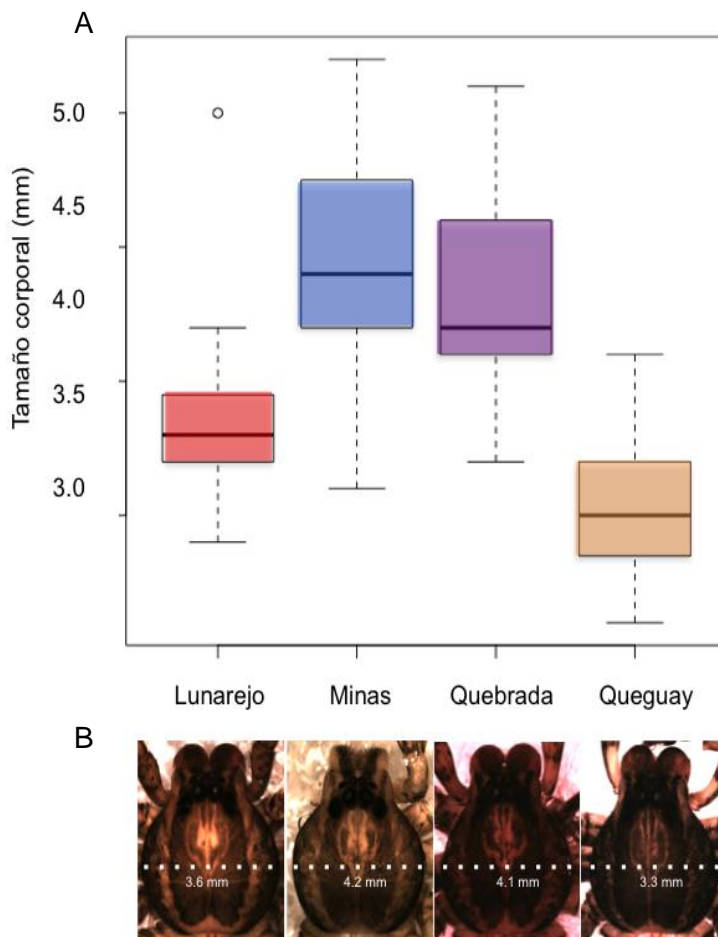
2- Mitocondrial

El análisis molecular se complementó con secuencias de fragmento (pb) de la subunidad I del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (662 bp), (más conocido como COI). Las secuencias fueron previamente obtenidas y cedidas por el Laboratorio de Aracnología de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil, para 8 individuos de cada una de las poblaciones (7 en el caso de Quebrada) y alineadas con el CLUSTALW en el programa MEGAX⁵⁰. Los haplotipos reportados y su distribución en las diferentes poblaciones se analizaron en Arlequin⁵¹. En este programa se realizaron las pruebas de neutralidad de Tajima⁵² y Fu⁵³, el Exact test⁴⁷ para evaluar la diferenciación genética a partir de las frecuencias haplotípicas⁵⁴, tanto global como entre pares de poblaciones. Finalmente se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA), formando dos grupos, uno solo con la población de Quebrada (que a la luz de los resultados parece la más diferenciada) y otro con las otras tres poblaciones. Al igual que para análisis con microsatélites, se examinó la presencia de un patrón de aislamiento por distancia. Además, utilizando el programa Popart⁵⁵ y el algoritmo *Minimum Spanning Network* se diagramó una red de haplotipos y finalmente se realizó la reconstrucción filogenética por Máxima Parsimonia, Máxima verosimilitud y Neighbor-joining con 1000 pseudoréplicas de bootstrap en el programa MEGAX⁵⁰, utilizando las secuencias depositadas en Genbank de *Trechaleoides biocellata* (KY018027), *Trechaleoides keyserlingi* (KY190306), y *Trechalea bucculenta* (KY190311) como grupo externo, otros géneros dentro de la familia Trechaleidae.

Resultados

Estudios morfológicos

El tamaño de los individuos varió significativamente entre las poblaciones ($F_{3,78} = 25.71$, $P < 0.0001$). De la comparación entre pares de poblaciones se observa que todos los valores muestran una diferencia significativa, con la excepción del par Minas-Quebrada (Tabla 2). Las medidas del tamaño corporal (estimado a partir del ancho del cefalotórax), indican que los individuos de la población de Minas son de mayor tamaño, seguidos por los de la Quebrada, Lunarejo. Por último los de Queguay son los más pequeños con valores promedio del ancho del cefalotórax menores (Fig. 3).



Diferenciación morfológica

Poblaciones	P valor
Lunarejo-Minas	<<0.001
Lunarejo-Quebrada	<0.01
Lunarejo-Queguay	0.02
Minas-Quebrada	0.71
Minas-Queguay	<<0.001
Quebrada-Queguay	<<0.001

Tabla 2 – P valores resultantes de la comparación del tamaño de los machos *P. ornata* entre pares de poblaciones utilizando el test de Tukey. Los valores significativos se resaltan en negro.

Figura 3 – A) Boxplot con valores promedio y desvío estándar del tamaño corporal de los machos medido por el ancho del cefalotórax para cada una de las cuatro poblaciones de estudio: Lunarejo (Rivera), Minas (Lavalleja), Quebrada (Treinta y tres) y Queguay (Paysandú). B) Foto de un ejemplar por población mostrando medida en mm.

Estudios genéticos

1-STR o microsatélites

Todos los loci fueron polimórficos en las cuatro poblaciones, encontrando en el conjunto de las poblaciones 3, 8, 8 y 13 alelos para los locus B2, B3, C1 y D4, respectivamente. Excepto por el locus C1, en todas las poblaciones se encontraron alelos exclusivos: B2 presentó dos alelos en Lunarejo, uno en Minas y uno en Quebrada, B3 presentó un alelo en Queguay y otro en Lunarejo, mientras que D4 presentó uno en Lunarejo, uno en Quebrada y tres en Queguay (Tabla 3). Considerando todas poblaciones

tanto el promedio de todos los loci como cada locus no mostraron apartarse del HWE. Sin embargo, se observaron apartamientos significativos del HWE para el locus B2 en las poblaciones de Lunarejo y Queguay, para el B3 en Lunarejo y Minas, y para el C1 en Minas y Quebrada (Tabla 3). No se encontraron frecuencias significativas de alelos nulos para ningún marcador ni población.

Tabla 3 – Información de los loci evaluados en las cuatro poblaciones de estudio la araña *P. ornata* (Lunarejo, Minas, Quebrada y Queguay). Se muestran los alelos presentes para cada locus de STR según su tamaño absoluto en pares de bases y su frecuencia, así como el número de individuos analizados por población (N), el número de alelos encontrados (Na), la probabilidad del test Exacto de apartamiento del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), la heterocigosis esperada (He) y observada (Ho). Los alelos exclusivos se muestran en color rojo y los valores significativos de HWE con un asterisco.

Locus	tamaño	Lunarejo						Minas					Quebrada					Queguay					HWE Global					
		Frec	N	Na	HWE	He	Ho	Frec	N	Na	HWE	He	Ho	Frec	N	Na	HWE	He	Ho	Frec	N	Na		HWE	He	Ho		
B2	98	0.10						-																				
	102	0.05*						-																				
	106	0.05*						-																				
	110	-						-						0.10*														
	112	0.40	10.0	5.00	0.02*	0.70	0.80	0.40	10.0	4.00	0.13	0.71	0.80	0.45	10.0	3.00	1.00	0.61	0.60	0.55	10.0	4.00	0.04*	0.62	0.70	0.70	0.58	
	114	0.40						0.35						0.45						0.30								
	116	-						0.20						-						0.05								
	122	-						0.05*						-						-								
B3	322	0.05*						-																				
	324	0.38						0.33												0.12								
	326	-						-						0.30						0.12								
	328	-						0.16						0.20						0.12								
	330	-	9.00	4.00	0.00*	0.73	0.66	0.05	9.00	5.00	0.10	0.81	0.70	0.15	10.0	5.00	0.10	0.81	0.70	0.12	8.00	6.00	0.27	0.81	0.87	0.87	0.58	
	332	0.27						0.16						0.25						0.12								
	342	-						-						-						0.13*								
	346	0.27						0.27						0.10						0.13								
C1	186	0.05						0.20						0.40					0.20									
	188	0.65	10.0	3.00	0.53	0.51	0.50	0.65	13.0	3.00	0.00*	0.64	0.15	0.40	10.0	3.00	0.00*	0.07	0.20	0.65	10.0	3.00	0.17	0.54	0.50	0.50	1.00	
	190	0.30						0.15						0.20					0.15									
D4	206	0.08						0.20						0.22					0.16									
	210	0.16						0.20						-					-									
	212	0.25						0.20						0.11					0.08									
	214	0.08						-						0.05					0.16									
	216	0.08						-						0.11					-									
	218	-	6.00	8.00	0.10	0.92	0.83	0.15	10.0	5.0	0.01*	0.82	0.40	0.11	9.00	8.00	0.06	0.89	0.55	0.16	6.00	8.00	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00	
	220	0.08						-						0.22					-									
	222	-						-						-					-									
	224	-						0.15						-					0.08									
	226	0.16						-						0.11					0.16									
	228	0.16						-						0.05					-									
	230	0.08						-						-					-									
	250	-						-						-					-	0.08*								
Loci combinados					0.61		0.13				1.00						1.00			0.03			1.00					

Tabla 4 – Distancia geográfica (Km), Fst y p valores globales y resultantes de la comparación pareada entre poblaciones la araña *P. ornata*. se muestra la diferenciación genética considerando el conjunto de loci de STRs (alélica y genotípica) y el gen mitocondrial COI. Los p valores significativos se resaltan en negro y los marginales se presentan subrayados.

Pares de poblaciones	Dist. Geográfica	STRs			COI	
		Fst	Alélica P valor	Genotípica P valor	Fst	P valor
Lunarejo-Minas	348.89	0.003	0.03	0.17	0.48	0.016
Lunarejo-Quebrada	235.91	0.049	< 0.01	< 0.01	0.63	0.001
Lunarejo-Queguay	167.49	0.011	0.10	0.24	0.13	0.039
Minas-Quebrada	166.61	0.006	< 0.01	<u>0.07</u>	0.37	0.004
Minas-Queguay	298.72	0.002	< 0.05	0.25	0.03	1
Quebrada-Queguay	273.30	0.016	0.03	<u>0.08</u>	0.31	0.009
Global	---	0.014	< 0.001	0.01	0.33	< 0.001

Se encontró diferenciación alélica y genotípica significativa del promedio de todos los loci ($p < 0.001$ y $p = 0.01$, respectivamente; Tabla 4). A nivel de las frecuencias genotípicas el único par de poblaciones que mostró diferencias significativas fue Lunarejo-Quebrada, mientras que Minas-Quebrada y Quebrada-Queguay mostraron diferencias marginales (Tabla 4). A nivel de las frecuencias alélicas excepto el par Lunarejo-Queguay, el resto mostró diferencias significativas. Los valores de Fst, son bajos y menores a 0.2 en todos los casos, valor por encima del cual se considera que las poblaciones están muy diferenciadas. Los valores mayores de Fst pareados corresponden al par Lunarejo-Quebrada, seguido por Quebrada-Queguay (Tabla 4). El locus B3 presentó la mayor diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones (Tabla A3- Anexo).

2- Mitocondrial: COI

Para el fragmento analizado se encontraron 8 haplotipos nuevos para la especie, distribuidos diferencialmente entre las poblaciones estudiadas (Fig. 4). Estos haplotipos presentaron entre 1 y 6 cambios, todos sinónimos, como es de esperar en una región codificante para proteínas. Entre todas las poblaciones hay una diferenciación significativa ($p < 0.001$). Los test de diferenciación genética basados en la frecuencia de los haplotipos entre pares de poblaciones, muestran que la diferenciación es significativa para los pares Lunarejo-Minas y Lunarejo-Queguay ($p < 0.05$), y todas las comparaciones con Quebrada ($p < 0.01$). Fue no significativa ($p > 0.05$) únicamente para Minas-Queguay (Tabla 4). De forma similar, el mayor valor de Fst fue para el par Lunarejo-Quebrada, mientras que el menor para Minas-Queguay. Esto indica que Quebrada es la población más diferenciada. Esta última presenta un haplotipo en baja frecuencia compartido con Minas y Queguay, y otro exclusivo en alta frecuencia. Las restantes tres poblaciones (Lunarejo, Minas y Queguay) presentaron cuatro

haplotipos, compartiendo el segundo de mayor frecuencia. Queguay es la única población que no presentó alelos exclusivos.

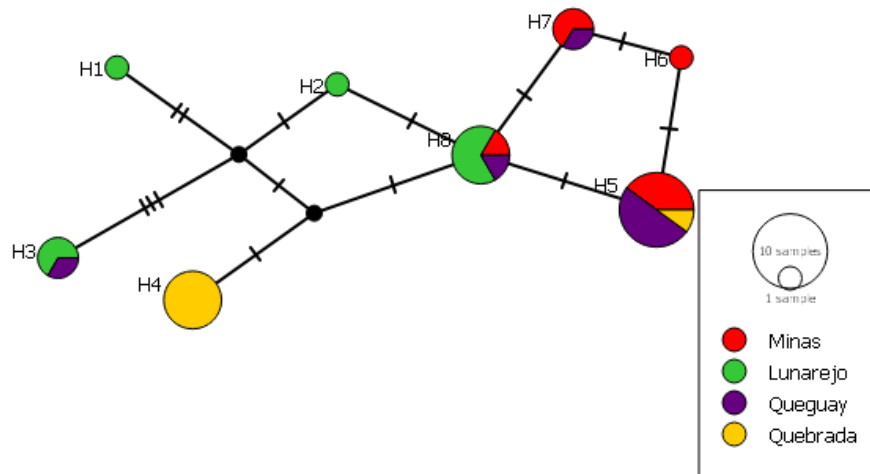


Figura 4 – Red de haplotipos en base a la secuencia parcial del gen COI de la araña *P. ornata*. Se muestran las frecuencias de cada uno en proporción al área del círculo, y las poblaciones en las que se presenta según código de color (Minas en rojo, Lunarejo en verde, Queguay en violeta y Quebrada en amarillo). La relación entre ellos se muestra con líneas y cada cambio nucleotídico con una raya perpendicular a ésta.

El AMOVA, al probar dos grupos, uno formado solo por Quebrada y el otro por el resto de las poblaciones, mostró que la diferenciación entre grupos fue aproximadamente el 30%, la diferenciación interna de las poblaciones casi un 60% y algo más del 10% se atribuye a la diferenciación entre las poblaciones. Los test de neutralidad, tanto de Fu como de Tajima, no mostraron diferencias significativas en ninguna población, ni para el conjunto de las mismas. La población de Quebrada por su parte, obtuvo un valor D de Tajima negativo marginal ($D = -1.36$, $p = 0.08$).

Todas las reconstrucciones filogenéticas realizadas recuperan la monofilia de la especie con fuerte apoyo de *bootstrap* (100% y 99%). Sin embargo, las relaciones internas entre los haplotipos de la especie presentan valores de *bootstrap* en el entorno o menores a 50% (Fig. 5; Figura A1, A2- Anexo)

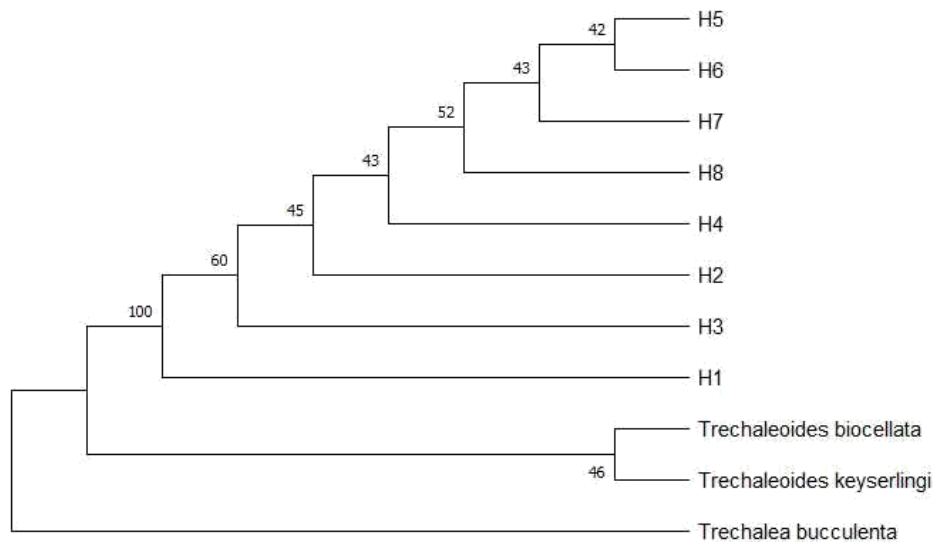


Figura 5 - Reconstrucción filogenética utilizando Máxima Verosimilitud de los haplotipos de *P. ornata* encontrados en este estudio, más los reportados para *Trechaleoides biocellata* y *T. keyserlingi*, usando como grupo externo *Trechalea bucculenta*. Los números sobre los nodos son los valores de consenso de 1000 pseudoréplicas de bootstrap.

Comparando los resultados obtenidos para STRs y COI, se observa que el par de poblaciones que se encuentra más diferenciado para ambos tipos de marcadores fue el de Lunarejo-Quebrada, mientras que el par menos diferenciado fue Minas-Queguay. En ambos casos, no se verificó un patrón de aislamiento por distancia, dado que no se encontró una correlación significativa entre las matrices de distancias genéticas y geográficas ($R_{STRs} = -0.24$, $p = 0.67$ y $R_{COI} = -0.28$, $p = 0.79$).

Discusión

Los resultados indican que las cuatro poblaciones estudiadas de *P. ornata* (Lunarejo, Minas, Quebrada y Queguay) están diferenciadas a nivel global, tanto al evaluar los marcadores nucleares como el mitocondrial, siendo la población de Quebrada la de mayor diferenciación, seguida por Lunarejo. Además, presentan una diferenciación importante en el tamaño de los individuos que no está asociada con la diferenciación genética encontrada. Esta última reflejaría la poca conectividad entre las poblaciones, lo que a su vez sugiere que las diferencias morfológicas, podrían ser adaptaciones a las condiciones locales, tanto ambientales como de las características particulares asociadas a cada cuenca^{5,8}, o simplemente el efecto de la deriva. Sin embargo, nos volcamos hacia la primera opción, por las razones que se exponen a continuación.

La diferenciación genética encontrada en este estudio, tanto en COI como en los STRs, es elevada globalmente y entre pares de poblaciones. Los valores de F_{st} estimados

por los STRs, son menores que aquellos que presenta la COI. Esto no es sorprendente, dado que los STR subestiman mucho la diferenciación entre poblaciones cuando la estructuración genética es alta⁵⁶. Además, no se encontró un patrón de aislamiento por distancia con ninguno de los marcadores moleculares utilizados, lo que indica que las poblaciones no se habrían diferenciado en equilibrio entre deriva local y flujo génico⁵⁷. La ausencia de equilibrio entre flujo génico y deriva genética imposibilita el uso del F_{st} como estimador de flujo génico⁵⁷, pero el grado de diferenciación genética encontrado permite especular sobre su baja probabilidad de ocurrencia. Es decir que un escenario compatible que surge del conjunto de resultados, es que la diferenciación de estas poblaciones ha sido en ausencia de flujo génico. Esto implicaría un alto grado de aislamiento entre las poblaciones y que se diferenciaron de forma independiente en Uruguay. De acuerdo con esta interpretación, se conoce que las arañas riparias se dispersan a través de los ríos y arroyos^{18,19}, y las poblaciones se encuentran en cuencas hidrográficas diferentes (Fig. 2). En el norte de nuestro país, las poblaciones de Queguay y Lunarejo pertenecen a la Cuenca del Río Uruguay y a la Del Río Negro, respectivamente. En el Sur, la población de Minas pertenece a la cuenca del Santa Lucía, mientras que la de Quebrada a la de la Laguna Merín^{58,59}. El hecho de pertenecer a diferentes cuencas implica que existen accidentes geográficos que condicionan la dirección de los cursos de agua interrumpiendo la dispersión de los individuos a lo largo de los mismos, consecuentemente aislando geográficamente a las poblaciones^{59,60,61}. La distribución de la especie incluye el sur de Brasil, norte de Argentina y Uruguay, siendo su centro en Río Grande del Sur, Brasil³⁰, lo que sugiere un proceso de colonización a través de los cursos de agua desde el norte hacia nuestro país (el extremo sur de su distribución). Lamentablemente, el análisis filogenético de los haplotipos que podría arrojar luz en este sentido, no resuelve las relaciones entre estos, por lo que no es posible sugerir direccionalidad en la colonización con esta información. Para esto es necesario incluir haplotipos de poblaciones de Brasil. De todas formas, si bien esta diferenciación tan marcada se pudo haber generado localmente (en Uruguay), alternativamente puede deberse a que las poblaciones de estudio proceden de diferentes grupos migratorios con poblaciones de orígenes previamente diferenciadas.

En esta línea, ambos tipos de marcadores muestran que la población de Quebrada es la más diferenciada genéticamente con respecto al resto. En la misma línea, los resultados del AMOVA muestran que una mayor proporción de la varianza es explicada por la variación entre grupos cuando Quebrada es separada de las otras tres poblaciones. De hecho, la distribución de haplotipos mitocondriales en la Quebrada es bien particular, debido a que presenta uno mayoritario exclusivo y uno de baja frecuencia compartido entre poblaciones. Este haplotipo compartido, es posible que sea ancestral y la “vincula genéticamente” al resto. La cuenca de la Laguna Merín, a donde pertenece la población de Quebrada, está delimitada por la Cuchilla Grande (Fig. 2); una serie de accidentes geográficos elevados que actúan

como interfluvios que la rodean casi completamente^{57,59} y limita la posible conexión con las demás cuencas⁵⁹. Por lo tanto, las poblaciones de Minas, Lunarejo y Queguay podrían llegar a tener un ancestro común más cercano entre ellas que con Quebrada. Esto implicaría que la población ancestral de la Quebrada procedería de una zona de Brasil diferente y previamente diferenciada de aquella de la que derivaron las restantes poblaciones. De hecho, esta hipótesis coincide con la distribución de cuencas hidrográficas a mayor escala (Fig. 6), ya que la cuenca de la Laguna Merín formaría parte de la misma región hidrográfica que la cuenca regional de la Costa Atlántica Este de Brasil, según la FAO^{62,63}, mientras que las otras tres estarían en otra región junto con la cuenca Del Plata. Es interesante ya que existen estudios que sugieren que los grandes ríos de esa cuenca presentes como el Paraná, Paraguay y Uruguay funcionan como corredores de biodiversidad⁶⁴.



Figura 6 –Regiones Hidrológicas de la Base de datos de Hidrología Analítica (AHD) con las cuencas principales tal como las define la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)⁶¹. En Uruguay se observan dos cuencas diferentes; la del Plata de color amarillo y la de la Costa Atlántica Este de color verde oscuro.

Sumado a esto, la población de Quebrada es la única que presenta valores negativos del D de Tajima, aunque marginales estadísticamente, lo que podría interpretarse como una expansión poblacional reciente. Este resultado también refleja que los eventos de diferenciación de Quebrada son diferentes al resto de las poblaciones, y puede influir en la

diferenciación tan marcada con respecto a estas. Esto no es sorprendente porque existen otros casos de endemismos en la zona tanto de fauna como de flora. Es el caso por ejemplo de la araña *Grammostola iheringi*⁶⁵ y de la planta *Ilex paraguayensis*⁶⁶, entre otros. Por otro lado, la población de Lunarejo presentó una diferenciación importante con el resto de las poblaciones y presentó dos haplotipos exclusivos, lo que sería reflejo de esta diferenciación en aislamiento debido a la ubicación en una cuenca hidrográfica diferente. Finalmente, el par de poblaciones Minas–Queguay, presentó una diferenciación genética baja, en ambos tipos de marcadores. Una posible explicación a esta baja diferenciación puede ser que, si bien pertenecen a cuencas diferentes, estas funcionan como sistemas abiertos⁵⁹ y el grado de conexión entre ellas es mayor a la de otros pares. Se conoce que existe una interconexión fluvial entre ellas (Río Queguay- Río Uruguay –Río de la Plata)⁵⁹, a la vez que presentan zonas bajas (litoral oeste del país) que en el caso de inundaciones de las riberas quedarían conectadas^{67,68,69}. Esto no sucede para las poblaciones de Lunarejo y Quebrada, dado el posible grado de aislamiento de estas poblaciones.

La variación morfológica evaluada en este estudio no está en concordancia con la diferenciación genética, lo que, en ausencia de flujo génico, indicaría un proceso de adaptación de los individuos a las condiciones locales. Por ejemplo, las poblaciones de Minas y Quebrada cuyos individuos son de tamaños similares se encuentran diferenciadas a nivel genético en la COI. Lo contrario sucede cuando se compara Minas-Queguay, dado que los individuos de Queguay tienen tamaños corporales significativamente más pequeños que los de Minas, pero sus diferencias genéticas son las menores. Es conocido que los procesos de adaptación local de las poblaciones a diferentes ambientes se reflejan en el desarrollo de diversos rasgos, entre ellos morfológicos^{70,71}. Si bien se evaluó un componente acotado de la variación morfológica (ancho del cefalotórax), este representa el tamaño corporal de los adultos⁷². En arañas, el tamaño de los individuos es un rasgo informativo de la abundancia de presas debido a que los individuos crecen a través de mudas y el tamaño final de los adultos depende de la cantidad y calidad de alimento ingerido durante las etapas inmaduras⁷³. Este rasgo es importante adaptativamente porque influye en la capacidad de captura de presas, en escapar de depredadores y en la reproducción^{35,39,73}. En este trabajo encontramos que las diferentes poblaciones de *P. ornata* difieren significativamente en su tamaño corporal. Existe evidencia de que este rasgo parece haberse fijado diferencialmente dado que la distribución de tamaños de los individuos de cada población natural es consistente a lo largo de distintos años e inclusive luego de un experimento de trasplante bajo condiciones de laboratorio (Albo *et al.* en preparación). De hecho, esta es una araña que vive asociada a ríos y arroyos^{18,19} y se alimenta de insectos que emergen del agua, como efímeras^{20,21}. Estos insectos tienen parte de su ciclo de desarrollo acuático y su emergencia como adultos depende entonces de las dinámicas de los cursos de agua. Los cambios en los caudales

como las inundaciones determinan que los ambientes riparios sean fluctuantes y estresantes para los organismos¹⁸. En este sentido, se ha sugerido que el ambiente de Queguay es mucho más inestable que el resto de las poblaciones estudiadas, con mayores variaciones climáticas e inundaciones, y menor disponibilidad de presas (Albo *et al.* en preparación). Los individuos en Queguay se encuentran bajo altas presiones selectivas, y deben invertir en crecer rápido, a costo de su tamaño, de forma de optimizar el tiempo de reproducción. Algo similar puede suceder en Lunarejo. Por lo contrario, en Minas las condiciones climáticas son menos cambiantes (menor variación en el rango de temperatura anual y menores coeficientes de variación de lluvia anual) y se ha evidenciado más disponibilidad de presas (Albo *et al.* en preparación), lo que concuerda con el mayor tamaño corporal encontrado en este estudio. De hecho, las variaciones climáticas (rango de temperatura y precipitaciones) en la Quebrada se asemejan a aquellas en Minas y sus individuos alcanzan un tamaño similar, lo que permite hipotetizar que la disponibilidad de presas es similar entre ambas poblaciones. Es posible entonces que la selección natural haya favorecido tamaños corporales menores en ambientes inestables, y tamaños mayores en ambientes estables (Albo *et al.* en preparación).

De la misma forma, las condiciones locales inciden directamente en las estrategias reproductivas de las especies siendo favorecida la evolución de rasgos flexibles que maximizan el éxito reproductivo^{17,74}. De hecho, en *P. ornata* la disponibilidad de presas no sólo determina la supervivencia y tamaño de los individuos sino que es relevante para la reproducción dado que los machos necesitan ofrecer a las hembras una presa en forma de regalo nupcial³³. No obstante, se conoce que los machos pueden ofrecer regalos simbólicos^{32,33}, los cuales son una modificación del comportamiento del macho en ausencia de presa^{38,75}. En este contexto la variación de regalos simbólicos encontrada en tres de estas poblaciones sería un reflejo de las condiciones ambientales particulares de cada población. Las diferencias significativas ya conocidas en la variación de la proporción de regalos simbólicos oscilan entre un 45-96%³⁴⁻³⁶. La población de Queguay presenta el mayor porcentaje de regalos simbólicos (casi un 100%) que sumado a los tamaños corporales menores sugiere que dichos rasgos podrían haber sido seleccionados favorablemente en ese ambiente cambiante⁷⁶. En este contexto, en un ambiente con poca disponibilidad de alimento o al menos poco predecible, son favorecidos aquellos machos que priorizan su supervivencia consumiendo las presas capturadas y ofreciendo como regalo los restos o inclusive partes vegetales. De acuerdo a esta interpretación, en la siguiente población que se registraron los valores más bajos de tamaño luego de Queguay fue Lunarejo, en donde también hay una gran variación en el rango de temperatura anual y un valor de proporción de regalos simbólicos alta (66%). Por otro lado, la población de Minas es la que posee individuos de mayor tamaño y el menor porcentaje de regalos simbólicos (45%). Estos rasgos posiblemente hayan sido seleccionados en un ambiente más estable y con mayor disponibilidad de presas

que les permite crecer más y utilizar su táctica reproductiva (regalo nutritivo) una vez satisfechos sus requerimientos alimenticios. El tamaño de los individuos en la población de Quebrada se asemeja a los de la población de Minas, y a grandes rasgos comparten condiciones climáticas similares, lo que podría sugerir que también es similar la disponibilidad de presas y predictibilidad del ambiente. Esto permite predecir que la población de Quebrada probablemente tenga un porcentaje de regalos simbólicos similar a la de Minas.

En conclusión, este estudio aborda por primera vez la diferenciación genética entre cuatro poblaciones de la araña neotropical *P. ornata* en Uruguay. Si bien no se puede verificar cómo las poblaciones han colonizado nuestro territorio, los resultados sugieren que posiblemente presenten dos orígenes geográficos diferentes y una diferenciación en aislamiento geográfico, en diferentes cuencas. Sumado a esto, se encontraron diferencias morfológicas que se alinean con las condiciones ambientales locales y que parecen determinar las tácticas reproductivas de las poblaciones sugiriendo un proceso de diferenciación adaptativo. Si este último aspecto se corrobora en más poblaciones, tanto el rasgo morfológico como el comportamental podrían utilizarse para inferir el grado de estabilidad y las dinámicas de un ecosistema, así como el estado de conservación y salud del mismo, otorgándole un rol ecosistémico importante a la especie.

Perspectivas

De seguir avanzando en este tema, el objetivo principal de futuros estudios sería profundizar en el conocimiento generado en esta tesis, evaluando más poblaciones, con aproximaciones moleculares y morfológicas más complejas, e integrando nuevos datos comportamentales. Estudiar otras poblaciones permitiría incorporar información comparativa y poder obtener resultados más robustos que permitan un mejor entendimiento en el vínculo entre adaptaciones a las condiciones locales y las dinámicas poblacionales. La diferenciación encontrada entre las poblaciones refleja un grado de aislamiento geográfico que coincide con su distribución en cuencas diferentes, lo cual facilitaría su diferenciación local por un lado a través de procesos adaptativos y por otro a través de la deriva genética. Una posible población conocida a evaluar se encuentra en el Departamento de Rocha (San Miguel), que si nuestra hipótesis es correcta ésta se parecería genéticamente a Quebrada ya que ambas pertenecen a la cuenca de la Laguna Merín. Asimismo, el estudio podría incluir poblaciones brasileras, y poner a prueba la hipótesis de que la gran diferenciación de la población de Quebrada en relación a las otras poblaciones se debe a que pertenece a una región hidrográfica diferente y por tanto podría provenir de otro grupo migratorio. Se podría proponer entonces la idea de que esta región podría funcionar como un corredor biológico de suma importancia en conservación, sumando más relevancia al territorio de la Quebrada como área protegida del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP). Asimismo se protegerían otras especies

endémicas y prioritarias para la conservación de la misma región^{66,66,77}. Sería razonable cuestionarse si, por esa razón, las poblaciones de *P. ornata*, de una región hidrográfica y de la otra, son especies crípticas, o están de hecho experimentando un proceso de especiación incipiente. Por esto la relevancia de incluir también poblaciones de diferentes cuencas de Brasil.

Sería interesante profundizar en análisis genéticos y morfológicos. En particular análisis genéticos multilocus, por ejemplo RADseq (Restriction site Associated DNA) u otras aproximaciones a escala genómica, que permitan revelar con mayor resolución el grado de conexión entre poblaciones, posibles eventos de introgresión, direccionalidad de la colonización y datar eventos de migración de cuencas y poblaciones. Por ejemplo, sería posible a través de análisis de RAD, que permiten la secuenciación de miles de partes del genoma. Sería además valioso complementar dichos estudios, con estudios de morfometría geométrica, que permitan evaluar la variación de la forma en un sentido más amplio y no restringirse solamente al tamaño corporal. Particularmente estudiar detalles de las genitalias de machos y hembras, lo que eventualmente corroboraría si el proceso de especiación se ha completado o no. Además, con esta herramienta morfológica se obtendría una “distancia morfológica” lo que permitiría ver su correlación con las distancias moleculares encontradas. De hecho, sería deseable integrar esta información con resultados comportamentales sobre porcentajes de regalos simbólicos y las variables ambientales de las nuevas poblaciones. A su vez, entre las poblaciones ya estudiadas, son necesarios más estudios en la población de Quebrada. Para esto son necesarios análisis sistemáticos de la disponibilidad de presas y proporción de regalos simbólicos a lo largo del tiempo, así como datos climáticos anuales. Existe evidencia reciente de que estos cambios en el tamaño han sido seleccionados a favor (es decir, no son plásticos en respuesta a lo que comen, sino que presentan alta heredabilidad, (Albo *et al.* en preparación), mientras que el comportamiento de ofrecer regalos simbólicos parecería tener diferentes grados de plasticidad dependiendo de la población. En este contexto el análisis de transcriptómica sería útil para evaluar qué genes están implicados en estos comportamientos, ya sea por expresión diferencial o por encontrar señales de evolución adaptativa en ellos.

Complementariamente sería muy bueno poder compartir este tipo de información al público en general, particularmente a la gente del territorio local a través de la difusión del rol de esta especie en el ecosistema. Las interpretaciones que podemos hacer en base a su comportamiento y ecología en su hábitat, convierten a *P.ornata* en una potencial especie indicadora y de interés para la conservación y entendimiento de los ecosistemas en los que habita⁷⁸. Dar a conocer esta información ayudaría a desmitificar las connotaciones negativas que culturalmente se les han dado a las arañas en general, lo cual conlleva a un descuido de su conservación. Además de su importancia biológica *per se*, estos animales cumplen

funciones que nos benefician a los seres humanos; son potenciales agentes de control biológico de plagas en agroecosistemas⁷⁹, controladores de insectos vectores e incluso algunas especies son un gran modelo biológico para la educación en especial en jóvenes⁸⁰. A su vez datos etnobiológicos muestran que estos animales han formado parte de la cultura de las sociedades a lo largo de los años, tanto en el arte⁸¹, en la literatura⁸², en la cocina^{83,84}, como en la medicina⁸⁵. Es por eso que poder conocer la biología de las arañas nos conducirá a un mejor vínculo con estos animales tan interesantes. En esta misma línea, se necesita generar conocimiento para poder desarrollar estrategias de conservación adecuadas y es allí donde radica la importancia de las investigaciones multidisciplinarias, en donde se integran varios enfoques y se obtiene una mejor contextualización, visualización y entendimiento de la naturaleza que somos y habitamos.

Bibliografía

1. Long, T. A. F., Agrawal, A. F. & Rowe, L. (2012). The effect of sexual selection on offspring fitness depends on the nature of genetic variation. *Current Biology*, 22, 204–208.
2. Kolluru, G. R. (2014). Genotype-by-environment interactions and sexual selection in guppies. *Animal Behaviour*, 282-311.
3. Endler, J. A. & Houde, A. E. (1995). Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 49, 456-468.
4. Grether, G. F., Millie, D. F., Bryant, M. J., Reznick, D. N., & Mayea, W. (2001). Rain forest canopy cover, resource availability, and life history evolution in guppies. *Ecology*, 82, 1546-1559.
5. Valladares, F., Matesanz, S., Guilhaumon, F., Araújo, M. B., Balaguer, L., Benito-Garzón, M., & Nicotra, A. B. (2014). The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, 17, 1351-1364.
6. Gonda, A., Herczeg, G., & Merilä, J. (2011). Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*)-local adaptation or environmentally induced variation? *BMC Evolutionary Biology*, 11, 75-86.
7. Ellers, J., & Boggs, C. L. (2004). Functional ecological implications of intraspecific differences in wing melanization in *Colias* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 79-87.
8. Kawecki, T. J. & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7, 1225–1241.
9. García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Papa, N., Serra, S., & Loureiro, M. (2020) Characterization of a hybrid zone between two annual killifish genus *Austrolebias* from the Biosphere Reserve and Ramsar Sites in South America. *Hydrobiologia*, 847, 421-442.

10. Tremblay, R. L., & Ackerman, J. D. (2001). Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society*, *72*, 47-62.
11. Masel, J. (2011). Genetic drift. *Current Biology*, *21*, 837-838.
12. Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., & Suazo Galdames, I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, *28*, 977-990.
13. Benítez, H. A., & Püschel, T. A. (2014). Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, *32*, 998-1008.
14. Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, *21*, 394-407.
15. Rotenberry, J. T., & Wiens, J. A. (1991). Weather and reproductive variation in shrubsteppe sparrows: a hierarchical analysis. *Ecology*, *72*, 1325-1335.
16. Kato, C., Iwata, T., Nakano, S., & Kishi, D. (2003). Dynamics of aquatic insect flux affects distribution of riparian web-building spiders. *Oikos*, *103*, 113-120.
17. Miller, C. W., & Svensson, E. I. (2014). Sexual selection in complex environments. *Annual Review of Entomology*, *59*, 427-445.
18. Lytle, D. A. (2002). Flash floods and aquatic insect life-history evolution: evaluation of multiple models. *Ecology*, *83*, 370-385.
19. Grether, G. F., Millie, D. F., Bryant, M. J., Reznick, D. N., & Mayea, W. (2001). Rain forest canopy cover, resource availability, and life history evolution in guppies. *Ecology*, *82*, 1546-1559.
20. Sanzone, D. M., Meyer, J. L., Martí, E., Gardiner, E. P., Tank, J. L., & Grimm, N. B. (2003). Carbon and nitrogen transfer from a desert stream to riparian predators. *Oecologia*, *134*, 238-250.
21. Iwata, T., Nakano, S., & Murakami, M. (2003). Stream meanders increase insectivorous bird abundance in riparian deciduous forests. *Ecography*, *26*, 325-337.
22. Hagen, E. M., & Sabo, J. L. (2014). Temporal variability in insectivorous bat activity along two desert streams with contrasting patterns of prey availability. *Journal of Arid Environments*, *102*, 104-112.
23. Berger, D., Grieshop, K., Lind, M. I., Goenaga, J., Maklakov, A. A., & Arnqvist, G. (2014). Intralocus sexual conflict and environmental stress. *Evolution*, *68*, 2184-2196.
24. Bussiere, L. F., Hunt, J., Stölting, K. N., Jennions, M. D., & Brooks, R. (2008). Mate choice for genetic quality when environments vary: suggestions for empirical progress. *Genetica*, *134*, 69-78.
25. Kwan, L., Bedhomme, S., Prasad, N. G., & Chippindale, A. K. (2008). Sexual conflict and environmental change: trade-offs within and between the sexes during the evolution of desiccation resistance. *Journal of genetics*, *87*, 383-394.

26. Vahed, K. (1998). The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biological Reviews*, 73, 43-78.
27. Lewis, S. M., Vahed, K., Koene, J. M., Engqvist, L., Bussiere, L. F., Perry, J. C., & Lehmann, G. U. (2014). Emerging issues in the evolution of animal nuptial gifts. *Biology Letters*, 10, 20140336.
28. Tveraa, T., Fauchald, P., Gilles Yoccoz, N., Anker Ims, R., Aanes, R., & Arild Høgda, K. (2007). What regulate and limit reindeer populations in Norway? *Oikos*, 116, 706-715.
29. Bårdsen, B. J., Fauchald, P., Tveraa, T., Langeland, K., & Nieminen, M. (2009). Experimental evidence of cost of lactation in a low risk environment for a long-lived mammal. *Oikos*, 118, 837-852.
30. Carico, J. E. (2005). Descriptions of two new spider genera of Trechaleidae (Araneae, Lycosoidea) from South America. *Journal of Arachnology*, 33, 797-813.
31. Albo M.J., C. Pavón· V. Franco-Trecu, S. Toft & T. Bilde. 2016. How ecological conditions affect worthless gifts probability in spiders? 16th International Behavioral Ecology Congress. Exeter, England
32. Albo, M. J., Melo-González, V., Carballo, M., Baldenegro, F., Trillo, M. C., & Costa, F. G. (2014). Evolution of worthless gifts is favoured by male condition and prey access in spiders. *Animal Behavior*, 92, 25-31.
33. Albo, M. J., & Costa, F. G. (2010). Nuptial gift-giving behaviour and male mating effort in the Neotropical spider *Paratrechalea ornata* (Trechaleidae). *Animal Behaviour* 79, 1031-1036
34. Albo, M. J., Pavón-Peláez, C., Franco-Trecu, V., Toft, S., & Bilde, T. (2016). How ecological conditions affect worthless gifts probability in spiders? *16th International Behavioral Ecology Congress*.
35. Franco-Trecu, V., Naya, D., Pavón-Peláez, C., Colina, M., & Albo, M. J. (2017). Factores ecológicos afectan las tácticas alternativas de apareamiento en una araña con regalo nupcial. *LX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, XXIV Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile*.
36. Pavón-Peláez, C., Colina, M., Franco-Trecu, V., Naya, D., Kruk, C. & Albo M.J. 2017. El ambiente ripario y su influencia sobre comportamiento reproductivo en arañas. *I Jornadas científicas Profesor Clemente Estable*. Montevideo, Uruguay.
37. Costa-Schmidt, L. E., Carico, J. E., & De Araújo, A. M. (2008) Nuptial gifts and sexual behavior in two species of spider (Araneae, Trechaleidae, *Paratrechalea*). *Naturwissenschaften*, 95, 731–739.
38. Albo, M. J. (2014). *Origen y evolución del regalo nupcial en arañas licosoideas y su congruencia con la filogenia* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias, Instituto de investigaciones Biológicas Clemente estable; Uruguay
39. Albo, M. J., Franco-Trecu, V., Wojciechowski, F. J., Toft, S., & Bilde, T. (2019). Maintenance of deceptive gifts in a natural spider population: ecological and demographic factors. *Behavioral Ecology*, 30, 993-1000.

40. Jakob, E. M., Marshall, S. D., & Uetz, G. W. (1996). Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*, *77*, 61-67.
41. R Team Core (2020). A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria.
42. Pandulli-Alonso, I., Germil, M., Albo, M. J., & Tomasco, I. H. (2020). Characterization of four hypervariable microsatellite loci in a nuptial gift-giving spider and its prospect for paternity analyses. *Arachnology*, *18*, 477-481.
43. Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. R. N. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, *16*, 1215.
44. Da Silveira, L. C. T., & Bonatto, S. L. (2009). Isolation and characterization of 12 dinucleotide microsatellite loci in *Paratrechalea galianoae* (Araneae, Trechaleidae), a nuptial gift-spider. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 539-541.
45. Sanguinetti, C. J., Dias, E. N., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, *17*, 914-921.
46. Raymond, M., & Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, *49*, 1280-1283.
47. Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, *139*, 457-462.
48. Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, *4*, 1-9.
49. Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, *38*, 1358-1370.
50. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz y Koichiro Tamura (2018) MEGA X: Análisis genético evolutivo molecular a través de plataformas informáticas. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547-1549
51. Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*, 479-491.
52. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, *123*, 585-595.
53. Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, *133*, 693-709.
54. Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945-959.
55. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*, 1110-1116.

56. Balloux, F., & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155-165.
57. Slatkin, M. (1994). Gene Flow and Population Structure. En: Real, L., Ed., *Ecological Genetics*, Princeton University Press, Princeton, 3-17.
58. Solari, A. B. (1978). La riqueza hidrográfica de la República Oriental del Uruguay. *Revista Geográfica*, 88, 221-228.
59. Achkar, M., Dominguez, A., & Pesce, F. (2013). Cuencas hidrográficas del Uruguay. Situación y Perspectivas ambientales y territoriales. Montevideo: Programa Uruguay Sustentable. 1547-1549.
60. Hoskin, C. J., Higgie, M., McDonald, K. R., & Moritz, C. (2005). Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437, 1353-1356.
61. Poulin, E (2013). Diferenciación Genética, Morfológica y Ecológica en el Complejo Agassizii del Género *Orestias* en las Cuencas de la Puna del Noreste del Chile. Tesis Doctoral, Universidad de Chile, Chile.
62. FAO. (2016). AQUASTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org/NR/water/aquastat/countries_regions/profile_segments/americas-WR_esp.stm
63. FAO (2020). Aquamaps. Food and agriculture organization of the United Nations. <https://data.apps.fao.org/aquamaps/>.
64. Giraud, A. R. y Arzamendia V. 2004. ¿Son los humedales fluviales de la Cuenca del Plata, corredores de biodiversidad? Los amniotas como ejemplo. Pp: 157-170, En: Neiff, J. J. (editor). *Humedales de Iberoamérica*. CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo – Red Iberoamericana de Humedales (RIHU). La Habana, Cuba. ISBN 959-270-036-2.
65. Postiglioni, R., & Costa, F. G. (2006). Aislamiento reproductivo entre tres poblaciones del género *Grammostola* de Uruguay (Araneae, Theraphosidae). *Iheringia. Série Zoológica*, 96, 71-74.
66. Hernández Olveyra, P. A. (2019). Estructuración geográfica de la variabilidad genética de *Iles paraguariensis* st.Hil.en el Uruguay (Tesis de *Magister* en Ciencias Agrarias) Universidad de la República, Facultad de agronomía, Uruguay.
67. Stebniki Cristobo, S. (2020). Variabilidad ambiental del bajo Río Uruguay y su efecto sobre la dinámica de la estructura trófica de la comunidad de peces. Tesis de maestría en Geociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
68. Erasan, V., Sapriza, G., Failache, N., Gamazo, P., Arcelus, A., & Nardin, A. (2019). Modelación hidrológica para la gestión del riesgo de inundaciones en subcuencas tributarias al río Uruguay. *Aqua-LAC*, 11.
69. Paullier, S., Bessonart, J., Brum, E., & Loureiro, M. (2019). Lista de especies de peces de la cuenca del río Queguay, río Uruguay Bajo. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 28, 66-78.

70. Metri, R., de Oliveira, A. R., & Baptista-Metri, C. (2016). Carapace shape of some aeglid crabs: plasticity at different levels. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44, 453-459.
71. Torres-Dowdall, J., Handelsman, C. A., Reznick, D. N., & Ghalambor, C. K. (2012). Local adaptation and the evolution of phenotypic plasticity in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66, 3432-3443.
72. Uetz, G. W., Papke, R., & Kilinc, B. (2002). Influence of feeding regime on body size, body condition and a male secondary sexual character in *Schizocosa ocreata* wolf spiders (Araneae, Lycosidae): condition-dependence in a visual signaling trait. *Journal of Arachnology*, 30, 461-469.
73. Foelix, R. (2011). *Biology of spiders*. Oxford University Press, USA.
74. Paugy, D. (2002). Reproductive strategies of fishes in a tropical temporary stream of the Upper Senegal basin: Baoulé River in Mali. *Aquatic Living Resources*, 15, 25-35.
75. Pavón-Peláez C, Pandulli-Alonso I, V Franco-Trecu, Theresa Jones & MJ Albo (en revisión). Spider individuals choose to produce different gift types but large males prefer to invest in expensive worthless gifts. *Animal Behaviour*.
76. Candolin, U., & Heuschele, J. (2008). Is sexual selection beneficial during adaptation to environmental change? *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 446-452.
77. Laufer, G., Gobel, N., Etchebarne, V., Carabio, M., Loureiro, M., Altesor, A., & Soutullo, Á. (2015). Monitoreo de biodiversidad del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. *Informe técnico*.
78. Silvano, R. A., Silva, A. L., Ceroni, M., & Begossi, A. (2008). Contributions of ethnobiology to the conservation of tropical rivers and streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18, 241-260
79. Lucio-Palacio, C. R., Monroy, J. C. A., & CMG, B. (2013). ¿Qué sabemos de las arañas de Guanajuato. *Investigaciones Geográficas*, 38, 69-83.
80. Ruiz, A. C. V., & Arevalo, J. C. P. (2017). Arañas para enseñar: posibilidades de enseñanza de la biología a través de la manipulación de arañas inofensivas. *Bio-grafía*, 1484-1488.
81. Monserrat, V. J., & Melic, A. (2012). Las arañas en la cultura y el arte de occidente. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)*, 50, 631-673.
82. Guerber, H. A., & Guerber, H. A. (1993). *The Myths of Greece & Rome*. New York, USA, Courier Corporation.
83. Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*, Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
84. González, F. C. V., & Contreras, A. T. R. (2009). La entomofagia en México. Algunos aspectos culturales. *El Periplo Sustentable: revista de turismo, desarrollo y competitividad*, 57-83.

85. Sanan, A., & van Loveren, H. R. (1999). The arachnoid and the myth of Arachne. *Neurosurgery*, 45, 152-157.

ANEXO- TABLAS

Tabla A1- Matriz de distancias geográficas para las poblaciones la araña *P. ornata* de Lunarejo, Queguay, Quebrada y Minas.

	Lunarejo	Queguay	Quebrada	Minas
Lunarejo				
Queguay	167.49 km			
Quebrada	235.91 km	273.30 km		
Minas	348.89 km	298.72 km	166.61 km	

Tabla A2- Información de los cuatro loci reportados por Tieppo-Silveira and Bonatto (2009) para la especie *P. galianoae*: B2, B3 C1, D4. Se muestran su tamaño absoluto en pares de bases (pb), el número de alelos (Na, la heterocigosis esperada (He) y observada (Ho).

Loci	Tamaño (pb)	Na	Ho	He
B2	126–130	3	0.760	0.595
B3	347–365	8	0.524	0.866
C1	206–212	4	0.769	0.683
D4	233–245	6	0.808	0.670

Tabla A3- Valores de diferenciación de las frecuencias alélicas y genotípicas para pares de poblaciones la araña *P. ornata* por locus de STRs y global para el conjunto de estos. Los valores globales significativos se resaltan en negro.

Diferenciación alélica					
	B2	B3	C1	D4	Global
Lunarejo-Minas	0.08	0.31	0.02	0.32	<0.01
Lunarejo-Quebrada	0.30	<0.01	0.03	0.51	<0.01
Lunarejo-Queguay	0.46	0.01	0.26	0.46	0.10
Minas-Quebrada	0.03	<0.01	0.03	0.03	<0.01
Minas-Queguay	0.08	0.06	0.38	0.08	0.04
Quebrada-Queguay	0.17	0.01	0.33	0.35	0.03
Global exact test	0.06	<0.01	0.09	0.10	<0.001
Diferenciación genotípica					
Lunarejo-Minas	0.11	0.50	0.09	0.58	0.02
Lunarejo-Quebrada	0.27	<0.01	0.11	0.79	<0.01
Lunarejo-Queguay	0.83	0.03	0.30	0.59	0.23
Minas-Quebrada	0.10	0.02	1.00	0.21	0.06
Minas-Queguay	0.35	0.14	0.55	0.21	0.4
Quebrada-Queguay	0.17	0.01	0.33	0.35	0.03
Global por locus- Exact test	0.10	<0.01	0.33	0.46	0.01

ANEXO- FIGURAS

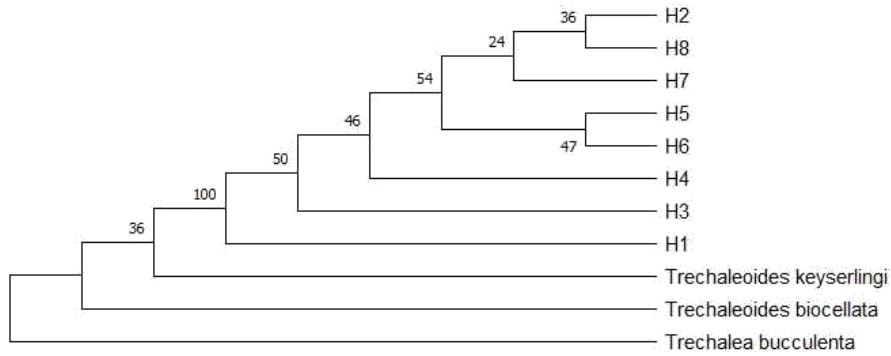


Figura A1- Reconstrucción filogenética por máxima parsimonia de los haplotipos de *P. ornata* encontrados en este estudio, más los reportados para *Trechaleoides biocellata* y *T. keyserlingi*, usando como grupo externo *Trechalea bucculenta*. Los números sobre los nodos son los valores de consenso de 1000 seudoréplicas de bootstrap.

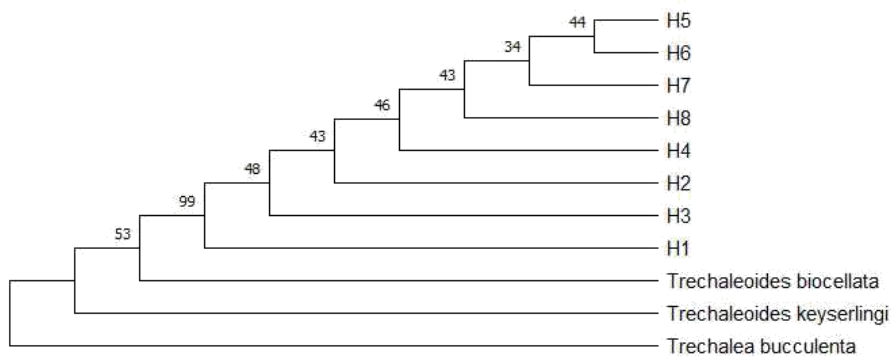


Figura A2- Reconstrucción filogenética por Neighbour Joining de los haplotipos de *P. ornata* encontrados en este estudio, más los reportados para *Trechaleoides biocellata* y *T. keyserlingi*, usando como grupo externo *Trechalea bucculenta*. Los números sobre los nodos son los valores de consenso de 1000 seudoréplicas de bootstrap.