



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



PEDECIBA



Ministerio
de Educación
y Cultura

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



iibce

Elección críptica femenina como factor determinante de la paternidad de una araña con regalo nupcial

Lic. Irene Pandulli

PEDECIBA Biología, Subárea Zoología,

Montevideo, Uruguay. 2020



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



Ministerio
de Educación
y Cultura



Título: Elección críptica femenina como factor determinante de la paternidad de una araña con regalo nupcial.

Autor: Lic. Irene Pandulli

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magister en Ciencias Biológicas en el marco del programa PEDECIBA.

Directora: Dra. María José Albo. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Co-directora: Dra. Ivanna Tomasco. Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Udelar.

Montevideo, Uruguay. 2020.

Tribunal:

Presidente:

Dr. Fernando Pérez-Miles

Sección Entomología. Facultad de Ciencias. UDELAR.

Vocales:

Dr. Alfredo Peretti.

Centro Científico Tecnológico CONICET. Universidad de Córdoba, Argentina.

Dra. Susana González

Genética de la conservación, Departamento de Biodiversidad y Genética. IIBCE.

Fuentes de financiación

PEDECIBA. Beca para pasantía en el exterior y evento científico.

Animal Behavior Society. Grant & award - Developing Nations Award.

American Arachnological Society, Vincent Roth Research Funds, USA.

Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República. Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE).

Contribuciones generadas de la tesis

Artículos científicos:

Pandulli-Alonso I, Germil M, Albo MJ & I Tomasco. 2020. Characterization of four hypervariable microsatellites loci in a nuptial gift-giving spider and its prospect for paternity analyses. *Arachnology* 18 (5), 477–481.

Pandulli-Alonso I, Tomasco I & MJ Albo. (en preparación). Beyond the nuptial gift: paternity bias exclusively favors a single male in spiders.

Presentaciones en congresos:

Pandulli-Alonso I, Tomasco I., M.J. Albo. 2019. Llegar tarde y sin cena no da una buena impresión: ¿qué sucede en la araña con regalo nupcial *Paratrechalea ornata*?. Segunda Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Montevideo, Uruguay: 80.

-Germil M., **Pandulli-Alonso I**, Albo M.J. & I Tomasco. 2018. Variación morfológica y genética en poblaciones uruguayas de la araña con regalo nupcial *Paratrechalea ornata*. V Congreso Uruguayo de Zoología, Montevideo, Uruguay.

-**Pandulli-Alonso I**, Pavón-Peláez C., Ferreira M., Tomasco I., Franco-Trecu V. & M.J. Albo. 2017. Estrategias reproductivas en arañas uruguayas: el caso del regalo nupcial simbólico. I Jornadas científicas Profesor Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.

-**Pandulli-Alonso I**, Ferreira M., Teliz N., Albo M.J. & I. Tomasco. 2016. Evaluación de microsatélites hipervariables en una araña poliándrica *paratrechalea ornata* para estudios de paternidad. IV Congreso Uruguayo de Zoología. Maldonado, Uruguay: 136.

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a mi familia por su apoyo, sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo. Por acompañarme durante este período de la vida académica, que conlleva sacrificios, enfrentarse a problemas, resolverlos de la mejor forma, lidiar con plazos y/o resultados no esperados; todas instancias que pueden traer una carga de estrés y emocionalidad importante si se las toma con compromiso.

En segundo lugar, a María José Albo e Ivanna Tomasco que confiaron en mí, y me brindaron sus conocimientos y su trabajo para lograr de este trabajo un producto integral.

Agradecimientos

A Magalí Ferreira y Nicolás Téliz que con mucho cariño y paciencia me acompañaron en las primeras instancias de la maestría, en colectas, mantenimiento y análisis moleculares preliminares.

A la directora María José Albo y a la codirectora Ivanna Tomasco por el apoyo en cada etapa, por la dedicación, por las enseñanzas y sobre todo por la oportunidad.

A los miembros del tribunal, al Dr. Fernando Pérez-Miles, al Dr. Alfredo Peretti y la Dra. Susana González por aceptar ser parte y aportar sus correcciones.

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por darme el espacio de laboratorio donde mantener a los animales, realizar los experimentos comportamentales, y llevar adelante el trabajo de análisis de datos. Especialmente a los compañeros que compartieron cada momento conmigo, por los apoyos en salidas de campo, cría y mantenimiento de animales.

Al Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias por facilitarme espacio de laboratorio y equipamiento donde realizar los análisis moleculares, y muchas horas de análisis. Especialmente a todas las personas del piso 6 con quienes compartí los últimos dos años.

A mi familia y amigos los cuales me apoyaron en esta difícil pero apasionante actividad que es la investigación biológica.

A los que apoyaron financieramente, que ya fueron mencionados con detalle anteriormente.

Tabla de contenido

Resumen.....	4
Summary	5
Introducción general	6
Capítulo 1.....	9
Resumen	10
Introducción	10
Materiales y métodos	11
Resultados	13
Discusión	13
Capítulo 2.....	18
Resumen	19
Introducción	19
Materiales y métodos	21
Resultados	24
Discusión	25
Consideraciones finales	36
Perspectivas.....	37
Referencias bibliográficas.....	38
Material Suplementario.....	43

Resumen: Típicamente se conoce que los machos maximizan su éxito reproductivo al aparearse con el mayor número de hembras posibles, mientras que las hembras lo logran al ser más selectivas. No obstante, a pesar de que un solo apareamiento a menudo le proporciona suficientes espermatozoides para fertilizar todos los huevos, en diferentes taxones se conoce que las hembras obtienen beneficios directos o indirectos al aparearse múltiples veces, generalmente con machos diferentes. De hecho, los sistemas de apareamientos múltiples son más comunes que los monógamos, involucrando procesos selectivos durante y después del apareamiento por parte de machos y hembras que finalmente pueden determinar sesgos en la paternidad. La elección críptica femenina puede promover presiones de selección posteriores al apareamiento mediante el sesgo en el éxito de la fertilización por parte de espermatozoides de diferentes machos basado en diversas características mostradas por los machos previamente que serían indicadores de calidad genética o estarían asociadas a beneficios de algún tipo para la hembra y las crías. Esto se ha reportado para diferentes especies, incluyendo arañas donadoras de regalos nupciales donde las hembras pueden almacenar espermatozoides de manera diferencial acorde con la presencia y características de regalo nupcial ofrecido por los machos. Usualmente las hembras de estas especies se aparean con varios machos de forma que adquieren múltiples regalos nupciales y múltiples eyaculados. En la araña *Paratrechalea ornata* existen dos tipos de regalos; nutritivo: presas frescas, y simbólico: restos de presas o partes vegetales. Durante el cortejo las hembras parecen elegir a los machos basadas en la presencia de regalo, mientras que la duración del apareamiento es similar con machos que ofrecían regalos nutritivos o simbólicos. Sin embargo, estas incrementan su fecundidad cuando reciben múltiples regalos nutritivos. En este trabajo se examinó a través de un enfoque molecular la existencia de sesgos en la paternidad a través de procesos post-copulatorios (i.e. elección críptica femenina) basados en el contenido del regalo en *P. ornata*. En el primer capítulo, se optimizaron microsatélites reportados para una especie del mismo género, de los cuales se genotiparon con éxito cuatro loci: B2, B3, C1 y D4 en aproximadamente 40 ejemplares. En el segundo capítulo se determinó la paternidad utilizando los marcadores moleculares optimizados, se realizaron experimentos comportamentales exponiendo hembras consecutivamente a dos machos, uno con regalo nutritivo y otro con uno simbólico, controlando también por el orden de apareamiento. Una vez las crías emergieron se contabilizaron, se genotiparon la hembra y los machos con los que había copulado y se asignó la paternidad a la descendencia. Los datos mostraron la existencia de un sesgo en la paternidad con el 83% de los casos a favor de un solo macho. Sin embargo, este sesgo no tuvo relación con el tipo de regalo, ni pareció depender del orden de apareamiento, su duración o el tamaño del macho. Los resultados de este trabajo significan un avance en cuanto a la metodología para el estudio de paternidad en esta especie de araña y sugieren que las hembras de *P. ornata* podrían sesgar la paternidad hacia uno de los machos, aunque el rasgo evaluado y preferido sería aún un interrogante.

Palabras claves: regalo nupcial, éxito reproductivo, procesos postcopulatorios, microsatélites, *Paratrechalea ornata*.

Summary: Males are typically known to maximize their reproductive success by mating with as many females as possible, while females do so by being more selective. However, despite the fact that a single copulation often provides enough sperm to fertilize all the eggs, in different taxa females are known to obtain direct or indirect benefits from mating multiple times, usually with different males (polyandry). In fact, multiple mating systems are more common than monogamous systems, involving selective processes during and after copulation by males and females that can ultimately determine biases in paternity. Cryptic female choice can promote post-copulatory selective pressures by biasing the success of fertilization of sperm from different males based on various characteristics previously shown by males that would be indicative of genetic quality or associated with benefits of some kind for the female and the offspring. This has been reported for different species, including nuptial gift-giving spiders where females can store sperm differentially according to the presence and characteristics of the nuptial gift offered by males. Usually the females of these species mate with several males so that they acquire multiple nuptial gifts and multiple ejaculates. In the spider *Paratrechalea ornata* there are two types of gifts; nutritious: fresh prey, and worthless: prey leftovers or plant parts. During courtship, females appear to choose males based on the presence of a gift, and mating duration is similar with males offering nutritive or worthless gifts. However, they increase their fertility when they receive multiple nutritive gifts. In this work, through a molecular approach, the existence of post-copulatory processes (i.e. cryptic female choice) based on the gift content was examined in *P. ornata*. In the first chapter, the reported microsatellites for a species of the same genus were optimized, of which four loci were successfully genotyped: B2, B3, C1 and D4 in about 40 spiders. In the second chapter, the paternity shared by two males was determined using the optimized molecular markers. Thus, behavioral experiments were performed exposing females consecutively to two males, one with a nutritive gift and the other with a worthless one, also controlling for the order of copulation. Once the offspring emerged, they were counted, the female and the males with whom they had copulated were genotyped and paternity was assigned to the offspring. The data showed that in 83% of the cases, there was a paternity biased towards a single male. However, this bias was not related to the type of gift, nor did it appear to depend on the copulation order, its duration, or the male size. The results of this work represent an advance in terms of the methodology for the study of paternity in this spider species and suggest that *P. ornata* females may bias paternity towards one of the males, although the evaluated and preferred trait would still be a question mark.

Keywords: nuptial gift, reproductive success, post-copulatory processes, microsatellites, *Paratrechalea ornata*.

Introducción general

Darwin propuso y desarrolló ampliamente la teoría de la selección sexual (Darwin, 1871), sugiriendo que los caracteres que incrementan el éxito reproductivo individual pueden evolucionar, aunque supongan un costo en términos de supervivencia. Distinguió dos formas de selección sexual: la competencia entre los machos por acceder a las hembras, o selección intrasexual, y la elección de macho que realizan las hembras, o selección intersexual. El esfuerzo reproductivo se materializa en la producción de gametos, el apareamiento y los cuidados parentales (Parker et al., 1972; Trivers, 1972). Las hembras invierten muchos recursos en producción de gametos y cuidados parentales, con lo que optimizan la elevada inversión realizada en óvulos. En cambio, los machos invierten, sobre todo, en conseguir apareamientos, por el menor valor energético que tendría para ellos la producción de espermatozoides (Bateman, 1948). Esto determina que desde un paradigma clásico los machos buscarían aparearse con el mayor número de hembras posibles, mientras que las hembras serían más selectivas, eligiendo algunos machos.

Sin embargo, se conoce que en diferentes taxones como artrópodos, peces, reptiles, aves y mamíferos, las hembras se aparean múltiples veces, la mayoría con machos diferentes (poliandria) (Awad et al., 2015; Duran et al., 2015; Hohoff et al., 2003; Marino et al., 2015; Muck et al., 2009). A pesar de que un solo apareamiento a menudo le proporciona suficientes espermatozoides para fertilizar todos los huevos, los sistemas de apareamientos múltiples son más comunes que los sistemas monógamos (Arnqvist & Nilsson, 2000). Los datos empíricos evidencian varias ventajas para las hembras al participar en múltiples apareamientos que involucran beneficios directos e indirectos. Los beneficios directos son aquellos que mejoran el éxito de las hembras durante el periodo reproductivo, tales como cuidado parental de varios machos, adquirir territorios necesarios para alimentación y/o reproducción (Simmons, 2005) o nutrientes (Fedorka & Mousseau, 2002; Gray, 1997), como recibir regalos nupciales (Lewis & South, 2012; Vahed, 1998, 2007). Por otro lado, aparearse múltiples veces le puede proporcionar a las hembras beneficios indirectos (genéticos), que comprenden genes o combinaciones de genes que aumentan el éxito reproductivo medio de la descendencia proveniente de varios machos en comparación con la descendencia de un solo macho (Fisher, 1930; Zahavi, 1975). Si la elección de aparearse múltiples veces radica en obtener beneficios indirectos, las hembras podrán utilizar mecanismos post-copulatorios para sesgar la fertilización de huevos con espermatozoides de ciertos machos y aumentar la diversidad/calidad genética y el éxito reproductivo de los descendientes (Jennions & Petrie, 2000). La elección críptica femenina, definida como la aparición de sesgos de paternidad entre machos, que surgen como resultado de rasgos conductuales, fisiológicos o morfológicos de las hembras (Eberhard, 1996), puede promover la selección posterior al apareamiento a través del almacenamiento o la utilización diferencial de espermatozoides (Bretman et al., 2009), o mediante su eyección (Burger, 2010; Dean et al., 2011). Por otro lado, la ocurrencia de poliandria trae aparejado que el esperma de distintos machos pueda coexistir y competir en el tracto de la hembra con la que han copulado, dando lugar a un mecanismo de selección sexual

post-copulatorio: la competencia espermática. Durante este proceso la capacidad del macho de fertilizar con éxito los huevos puede depender de diferentes características, incluyendo la capacidad de eliminar o desplazar los espermatozoides de otros machos, la capacidad de competir directamente contra otros espermatozoides para alcanzar y fertilizar los huevos, o evitar que las hembras vuelvan a aparearse a través de los tapones genitales (Kvarnemo et al., 2013) o guardias (Alcock, 1994).

Los sistemas de apareamiento poligámicos son ideales para estudiar los diversos factores que influyen en los procesos post-copulatorios y en definitiva en el éxito reproductivo de los individuos. Este es el caso de las especies donadoras de regalos nupciales donde las hembras usualmente se aparean con varios machos de forma que adquieren múltiples regalos nupciales (beneficios directos) y múltiples eyaculados (beneficios indirectos) (Arnqvist & Nilsson, 2000). El macho transfiere el regalo nupcial a la hembra antes o durante el apareamiento; los regalos pueden aumentar, disminuir o ser neutrales para el éxito de ambos sexos (Lewis & South, 2012; Vahed, Road, & Gb, 1998). Los regalos nupciales se han clasificado en dos tipos: endógenos cuando son secretados por los machos, o exógenos cuando se producen utilizando materiales u objetos de los alrededores (Lewis & South, 2012). Existe una gran diversidad de formas, incluidos alimentos o presas como en el caso de algunas moscas (Empíididae); secreciones glandulares como ocurre en cucarachas (Blattidae) donde las hembras se alimentan de ácido úrico secretado por los machos, o como en los tetigónidos (Tettigoniidae) donde los machos producen el spermatophylax, una masa gelatinosa unida al espermatóforo, que es consumida por la hembra durante la transferencia espermática (Gwynne, 2008; Lewis & South, 2012; Lewis et al., 2014). En especies con regalos nupciales podría ocurrir que las hembras evaluaran las características del regalo (presencia, calidad nutricional, aspecto, etc.) con una posible interacción con el fenotipo masculino (atributos y calidad del macho), pudiendo además ejercer selección a nivel post-copulatorio (elección críptica femenina) si ha copulado con machos diferentes que han ofrecido regalos de distinto tipo.

En arañas, algunos regalos consisten en materiales recolectados como presas frescas (regalos nutritivos), restos de presas o partes vegetales (regalos simbólicos) que son envueltos en seda por los machos (Albo et al., 2014; 2011; Bristowe, 1958; Costa-schmidt & Carico, 2008). Esto resulta en dos tácticas de apareamiento (AMTs por su sigla en inglés), existiendo una táctica dominante y otra alternativa que ocurre en menor frecuencia y obtiene menor éxito reproductivo que la primera (Brockmann, 2001; Gross, 1996; Taborsky et al., 2008). Este es el caso de la especie paleártica *Pisaura mirabilis* (Pisauridae) en donde la proporción de regalos simbólicos es de un 30% en la naturaleza y las hembras reducen la duración del apareamiento cuando los machos que ofrecen regalos simbólicos (Albo et al., 2019; 2011). Esta especie ha sido muy estudiada en relación a los procesos selectivos experimentados por ambos sexos (Andersen et al., 2008; Bilde et al., 2006; Drengsgaard & Toft, 1999; Prokop, 2007; Prokop & Maxwell, 2009; Stalhandske, 2002). Los machos de *P. mirabilis* pueden copular sin ofrecer un regalo, pero las hembras prefieren machos con regalo. La presencia del regalo aumenta en gran medida el éxito de apareamiento, la prolonga y facilita la posición (Stalhandske, 2001). Las hembras almacenan más espermatozoides de machos con regalos nupciales que de machos sin regalo (Albo et al., 2013). Algo similar ocurre en la araña neotropical *Paratrechalea ornata*

(Trechaleidae), donde los machos pueden ofrecer regalos nutritivos o simbólicos (Albo et al., 2014). Al momento la evidencia empírica indica que la táctica empleada, i.e.: el tipo de regalo, es un rasgo plástico representando una estrategia condicional que esta modulada por la disponibilidad de presas y la condición corporal del macho (Albo et al., 2014; Pavón-Peláez et al., en revisión). A diferencia de los ejemplos de AMTs en esta especie los regalos simbólicos se encuentran en altas proporciones pudiendo llegar al extremo de casi 100% en algunas poblaciones (Albo et al., en revisión). Se conoce que las hembras favorecen la ocurrencia y duración del apareamiento con los machos que ofrezcan regalos sobre aquellos sin regalo (Albo et al., 2014). Durante el cortejo las hembras parecen elegir a los machos basadas en la presencia de regalo y no en su contenido dado que aceptan con la misma frecuencia apareamientos con regalos nutritivos y simbólicos (Pandulli-Alonso et al., 2017). Esto no es sorprendente ya que al parecer las hembras sólo pueden reconocer el contenido del regalo una vez comienzan a comerlo durante el apareamiento. La duración del apareamiento también es similar con regalos nutritivos o simbólicos, aunque se ha sugerido que las hembras podrían sesgar el número de espermatozoides almacenados dependiendo del contenido del regalo (Albo & Peretti, 2015). Incluso, al obtener regalos nutritivos luego de múltiples apareamientos, las hembras aumentan su fecundidad y obtienen una mayor número de crías que cuando reciben regalos simbólicos (Pandulli-Alonso et al., 2017). Sin embargo, no está claro si existe elección críptica femenina en base al contenido del regalo y que consecuentemente sesgue la paternidad de los machos.

El objetivo general de este trabajo fue examinar la existencia de procesos post-copulatorios, en particular elección críptica femenina, basada en el contenido del regalo en *P. ornata*. En el Capítulo 1, se evaluaron 12 microsatélites reportados para una especie del mismo género (Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009) y se caracterizaron un conjunto de loci polimórficos en cerca de 40 ejemplares procedentes de cuatro poblaciones. En el Capítulo 2, se realizaron experimentos comportamentales y mediante los microsatélites caracterizados, se estimó la paternidad de la descendencia de hembras que se aparearon consecutivamente con machos donadores de regalos simbólicos y nutritivos. Conociendo las proporciones de paternidad encontradas para cada macho se evaluó si las hembras favorecen crípticamente a machos según el tipo de regalo.

Capítulo 1

Caracterización de cuatro microsatélites hipervariables en una araña donadora de regalos nupciales y su perspectiva para análisis de paternidad.

Pandulli-Alonso I, Germil M, Albo MJ & I Tomasco. 2020. Characterization of four hypervariable microsatellites loci in a nuptial gift-giving spider and its prospect for paternity analyses. *Arachnology* 18 (5), 477–481.

Capítulo 1. Caracterización de cuatro microsatélites hipervariables en una araña donadora de regalos nupciales y su perspectiva para análisis de paternidad.

Pandulli-Alonso, I.¹; Germil M^{1,2}; Albo, M. J.¹ & I. Tomasco²

¹Departamento de Ecología y Biología Evolutiva. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Montevideo, Uruguay

Resumen

En la araña de regalos *Paratrechalea ornata*, las hembras se aparean varias veces y aparentemente puede sesgar la paternidad según el contenido del regalo nupcial (nutritivo o simbólico). Los estudios de paternidad que utilizan marcadores de microsatélites serían, por lo tanto, ideales para estudiar el éxito de la fertilización del macho en la descendencia. Se genotiparon cuatro microsatélites previamente reportados en una especie del género usando 43 individuos de cuatro diferentes localidades en Uruguay. Se describe la variación alélica y genotípica en todos los loci y compara los hallazgos con la variación informada para el género. Excepto por un locus, todos los loci mostraron desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg debido al déficit de heterocigotas. Esto posiblemente podría explicarse a la naturaleza mixta de la muestra y el efecto de la estructura poblacional. Estos loci, y especialmente aquellos que son altamente hipervariables, son una herramienta importante para la evaluación de paternidad y permitirán una mejor comprensión del papel de los procesos post-copulatorios en *P. ornata*.

Palabras clave: Araneae • marcadores moleculares • Araña neotropical • *Paratrechalea ornata* • STR • Uruguay

Introducción

En los sistemas de apareamiento donde las hembras son poliándricas y tienen fertilización interna, el éxito de la paternidad de los machos no solo depende del acceso a los apareamientos sino también del éxito de fertilización de los óvulos de las hembras. Esto se debe a que los procesos pre-copulatorios (características del cortejo y apareamiento) y post-copulatorios (características de competencia espermática) finalmente interactúan determinando el éxito de los individuos (Devigili et al., 2015; McDonald et al., 2017; Péliissié et al., 2014).

Una cuestión fundamental para comprender el efecto de estos procesos en el éxito reproductivo individual es conocer la paternidad compartida por los machos. Tradicionalmente en invertebrados, los estudios de paternidad se han desarrollado utilizando la técnica de macho estéril (Bjork & Pitnick, 2006; Hotzy & Arnqvist, 2009; House & Simmons, 2003; Sirot et al., 2007; van Lieshout & Elgar, 2011). Esta técnica implica la exposición de los machos a rayos x, lo que da como resultado, machos estériles, pero con espermatozoides aún con capacidad competitiva y capaces de fertilizar óvulos femeninos, pero que no continúan con su desarrollo. A pesar de la simplicidad y el bajo costo, esta técnica es limitada en varias formas (por ejemplo, en el número de padres que se puede identificar), y en su lugar se prefieren los marcadores moleculares como los microsatélites (Helminen et al., 1988). Los microsatélites, también conocidos como repeticiones en tándem cortas (STR por su sigla en inglés: short tandem repeat), son marcadores moleculares hipervariables de ADN repetitivo (rango de longitud 2-10 pb) que puede mostrar altos niveles de polimorfismo intraespecífico (Planas et al., 2014). Se han caracterizado y utilizado múltiples microsatélites para la evaluación de la paternidad en

diversas especies de invertebrados (Fraser et al., 2014; Rojas-Hernandez et al., 2014; Van Oosten et al., 2016; Yue et al., 2010).

En comparación con muchos otros taxones, el uso de microsatélites para análisis de paternidad apenas se ha aplicado en arañas (Kreherwinkel et al., 2019; Schäfer et al., 2008; Tuni et al., 2012; Uhl et al., 2015), muy probablemente porque la técnica de macho estéril se ha utilizado con éxito en este grupo (Austad, 1982; Christenson & Cohn, 1988; Danielson-François et al., 2012; Drengsgaard & Toft, 1999; Kaster & Jakob, 1997; Neumann & Schneider, 2015; West & Toft, 1999), e incluso recientemente validada (Magris, Wignall, & Herberstein, 2015). La especie *Paratrechalea galianoae* (Carico, 2005) es una de las pocas arañas neotropicales para las cuales se han aislado y reportado 12 microsatélites (Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009). En 27 individuos de esta especie, esos loci mostraron un alto polimorfismo, y se identificaron entre tres y 14 alelos. Aunque se sabe poco sobre esta especie en particular, se documenta que el género tiene machos que ofrecen regalos nupciales a las hembras como estrategia reproductiva (Albo & Costa, 2010; Costa-schmidt & Carico, 2008).

La presencia de regalos nupciales es típica en la especie semiacuática *Paratrechalea ornata* (Mello-Leitão, 1943), que es una especie modelo para estudiar la selección sexual en relación con esta estrategia reproductiva particular (Albo et al., 2014). Los machos pueden ofrecer regalos nutritivos (presas) o simbólicos (restos de presas o pequeñas partes de plantas) envueltos en seda (Albo & Costa, 2010). Las hembras son poliándricas (Pandulli-Alonso et al., 2017) y se ha sugerido que pueden sesgar el almacenamiento de espermatozoides y la paternidad hacia los machos que ofrecen regalos nutritivos (Albo & Peretti, 2015). La comprensión de los complejos procesos post-copulatorios y los patrones de paternidad en esta especie requiere, por lo tanto, el desarrollo de nuevas técnicas. El objetivo de este estudio fue probar la amplificación cruzada de loci de microsatélites descritos en otra especie en *P. ornata*, y evaluar la viabilidad de la amplificación por PCR y la variabilidad de alelos de los loci de microsatélites en *P. ornata*, utilizando los que ya se informaron para la especie *P. galianoae* (Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009).

Materiales y métodos

Fueron seleccionados al azar a 43 individuos adultos de *P. ornata*. Dichos individuos fueron recolectados por María José Albo y colaboradores durante 2012-2016 en cuatro localidades (Figura 1): 10 de la Quebrada de los cuervos, Departamento de Treinta y Tres (S 32° 56' 58.261'' O 54° 27' 21.808''); 10 de Lunarejo, Departamento de Rivera (S 31° 13' 50.653'' O 55° 52' 17.835''); 10 de Queguay, Departamento de Paysandú (S 32° 8' 8.344'' O 57° 56' 32.168'') y 13 de Paso del Molino, Departamento de Lavalleya (S 34° 16' 39.256'' O 55° 14' 0.729''). Todos los individuos fueron conservados en etanol al 75% y depositados en la colección del IIBCE.

El ADN fue extraído a partir de 4 patas de las arañas siguiendo el protocolo modificado ya que el original trabajaba sobre sangre y con volúmenes mayores (Miller et al., 1988) y las concentraciones de ADN cuantificadas usando nanodrop (espectrofotómetro NANADROP LITE, Thermo Scientific). Fue realizada la amplificación por PCR en un volumen total de 10 µl que contenía: 0.1 µl de Taq Polimerasa (5 unidades / µl), 1 µl de Tampón, 0.8 µl de MgCl₂ (25mM), 0.2 µl de cada cebador (10Mm), 0.2 µl de dNTPs incluyendo 10 mM de cada dNTP, 2.5 µl de agua libre de ARN y ADN y 5 µl de dilución de ADN (4 ug / µl). Las condiciones de

amplificación fueron: 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 s de desnaturalización, 56°C durante 30 s de asociación y 72°C durante 30 s de extensión, y una extensión final a 72°C durante 5 min. En cada reacción, fue incluido el control negativo correspondiente reemplazando el volumen de la muestra de ADN por el mismo volumen de agua libre de ADN. Cuando había una falla de amplificación, fueron probadas otras reacciones bajo las siguientes condiciones: i) disminuyendo la temperatura de asociación hasta 47°C, ii) aumentando la concentración de ambos cebadores, iii) aumentando la concentración de Taq Polimerasa, iv) aumentando la concentración de MgCl₂ hasta 3.5 mM en volumen final. Fueron analizados los 12 loci reportados por Tieppo Da Silveira y Bonatto (2009) para *P. galianoae*: A1, A6, B2, B3, B4, C1, D2, D4, F1, F2, G1 y H2. En todos los casos, el cebador directo de cada par fue marcado con fluorescencia con FAM o HEX. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida durante 20 minutos a 170 V, y visualizados en tinción con Nitrato de plata usando el protocolo modificado por Sanguinetti y colaboradores (1994). El tamaño de los productos de PCR fue estimado mediante el contraste del peso con un estándar de tamaño de ADN de 100 pb (RAINBOW Bioron). Las amplificaciones exitosas fueron sometidas a electroforesis en un analizador genético ABI 3130 ubicado en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur (Montevideo, Uruguay). Fue incluido un estándar de tamaño LIZ600 en todos los carriles. Fueron determinados los tamaños de los fragmentos y asignados los genotipos utilizando el software Peak Scanner Software (Applied Biosystems).

El programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995) fue utilizado para: i) estimar las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y esperadas, ii) probar las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y el desequilibrio de ligamiento entre un pares de loci utilizando la prueba exacta basada en 10.000 iteraciones de la cadena de Markov, iii) evaluar la presencia de alelos nulos por Máxima Verosimilitud, iv) probar la diferenciación alélica y genotípica entre las poblaciones. El programa Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007) fue utilizado para estimar el Contenido de Información Polimórfica (PIC por su sigla en inglés), la probabilidad de no exclusión de paternidad (primer y segundo padre, NE-1P y NE-2P, respectivamente) y la combinación de probabilidad de no exclusión de identidad (NE-I) para cada marcador y valores generales para el conjunto de microsatélites.

Además, fue realizada una primera prueba preliminar, donde se evaluaron las extracciones de ADN de 7 hembras y sus crías de campo. Las hembras con ootecas fueron colectadas de la población de Minas, Departamento de Lavalleja y mantenidas en laboratorio hasta la eclosión de las crías. Estas 14 muestras (7 hembras y 7 camadas) se realizaron para probar si la extracción y posterior amplificación serían exitosas en las crías. Acorde con los resultados de la primera prueba, fue realizada una segunda prueba piloto utilizando una hembra y 25 crías de su ooteca (aproximadamente ¼ del número total de arañas). La hembra que llevaba un saco de huevos fue recolectada previamente del campo también de la población de Minas y fue criada hasta que las arañas se dispersaron de la ooteca. La hembra y las arañas fueron conservadas en etanol al 95%. Se extrajo el ADN a partir de patas de la hembra y de la camada de crías, según protocolo mencionado anteriormente. Se amplificaron los microsatélites optimizados: B2, B3, C1 y D4. Se siguió el mismo protocolo realizado anteriormente para obtener los genotipos.

Resultados

Fueron genotipados con éxito cuatro loci: B2, B3, C1 y D4, mientras que los ocho loci restantes no se amplificaron, o lo hicieron parcialmente o de manera no reproducible para *P. ornata*; así que fueron descartados para los análisis.

Se encuentra un resumen de la información en la Tabla 1, que muestra el tamaño absoluto y las frecuencias de los alelos presentes en la muestra, e índices como PIC, NE-1P, NE-2P y NE-I por locus. Fue encontrada una alta variación de alelos en los cuatro loci, incluidos 3, 8, 8 y 13 alelos en C1, B3, B2 y D4, respectivamente, mientras que las frecuencias de alelos oscilaron entre 1 y 53%. Los cuatro loci genotipados presentaron valores muy diferentes para la heterocigosidad, que se encontró en el rango de 0.35 a 0.73, así como para otros índices como el PIC que presentó el rango de 0.53 a 0.86. De acuerdo con las características de estos dos índices, aquellos loci con más alelos y con frecuencias de alelos más distribuidas uniformemente presentaron los valores más altos. Esto se observa bien comparando, por ejemplo, los valores de PIC entre los loci B2 y B3. Ambos marcadores tienen el mismo número de alelos, pero el PIC es mucho mayor en B3 (PIC = 0.80) que en B2 (PIC = 0.53), ya que este último tiene dos alelos de alta frecuencia (es decir: 0.45 y 0.37) y el resto a baja frecuencia.

Todos los loci excepto el loci B2 mostraron una heterocigosidad observada significativamente menor que la esperada por HWE al considerar la muestra completa con todas las poblaciones ($p < 0.001$). Sin embargo, no encontramos salidas HWE para la mayoría de los loci en poblaciones individuales. Además, no encontramos una frecuencia significativa de alelos nulos (diferentes de cero) en todos los loci. La prueba exacta para la diferenciación genómica y genotípica entre poblaciones fue altamente significativa ($p < 0.01$).

Encontramos que las extracciones de ADN para las 7 hembras fueron exitosas, pero no para todas las crías, por lo cual sugerimos el uso de kit de extracción en estos casos para maximizar el éxito. El análisis de los genotipos de la hembra y sus arañas agrupadas confirmó la presencia de alelos maternos en el último y la ausencia de una mayor contribución de variación por parte del padre (s). En particular, los genotipos de las arañas cría fueron: B2: 112/114, C1: 188 / 188, D4: 212/214, B3: 328/328. Todos los marcadores amplificaron exitosamente en hembras y crías.

Discusión

De los 12 microsatélites polimórficos (3-13 alelos por locus) informados para una especie del género *Paratrechalea* por Tieppo Da Silveira & Bonatto (2009) y evaluados aquí, amplificamos y genotipamos con éxito cuatro loci (B2, B3, C1 y D4). Este resultado probablemente refleja la presencia de sustituciones de nucleótidos en las secuencias flanqueantes de los 8 loci restantes en la especie *P. ornata* que obstaculizan la asociación de cebadores durante la PCR. Para los loci C1 y B3 encontramos una variación alélica similar a la descrita en *P. galianoae* (Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009), pero para B2 y D4 encontramos un mayor número de alelos que indican la importancia de la evaluación de marcadores antes de su uso en otras especies. La diferencia observada, puede deberse a que evaluamos diferentes especies, como también podría deberse a que en este trabajo fue examinado un tamaño de muestra mucho más grande (43 individuos) y diverso (cuatro

localidades) en comparación con el estudio realizado en *P. galianoae* (24 individuos de una sola localidad). Consideramos que estas diferencias no son el resultado de causas intrínsecas de la especie, como el tamaño de población en *P. ornata*, porque la heterocigosidad promedio de ambas especies es similar en todos los loci. En cualquier caso, se sabe que la transferibilidad entre especies de marcadores de microsatélites se distribuye de manera desigual entre los taxones (Barbará et al. 2007); por lo tanto, necesitamos evaluar su viabilidad caso por caso.

Los resultados revelaron que los cuatro loci estaban muy apartados del HWE, particularmente debido un déficit de heterocigotas, en tres de ellos y, según los datos, esto no se debe a la presencia de alelos nulos. Debido a que nuestra muestra está compuesta por cuatro subpoblaciones distantes geográficamente, una explicación adecuada podría ser el conocido efecto Wahlund (Wahlund 1928). Esto implica una reducción de la heterocigosidad en una población causada por la estructuración de la misma en subpoblaciones. Es decir, si las subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas, la heterocigosidad general de la población como un todo se reduce, incluso si las subpoblaciones mismas están en HWE. En línea con esta interpretación, encontramos que, en la mayoría de los casos, los loci no se apartaron de HWE dentro de cada subpoblación, y se encontró una diferenciación significativa entre las poblaciones tanto en frecuencia génica como genotípica.

Se conoce que el uso de marcadores microsatélites presenta limitaciones, por ejemplo la ausencia de HWE y la presencia de alelos nulos dificultan el uso de estos para ciertas aplicaciones, como la evaluación de paternidad tradicional (Jones & Ardren, 2003). Sin embargo, es una herramienta genética moderna y valiosa para la evaluación de paternidad (Taylor et al., 2014; Webster & Reichart, 2005) y se han publicado posibles soluciones a las limitaciones (Huang et al., 2018). En nuestro caso particular, la variación encontrada en estos marcadores los hace ideales para estudios de paternidad entre machos conocidos, por ejemplo, mediante el uso de la técnica de “PCR competitivo por microsatélites” (Bussiere et al., 2010; Wooninck et al., 2000). Esta técnica puede determinar la contribución de los machos en una muestra de espermatozoides, así como explicar las proporciones de paternidad de una camada completa. Es una herramienta frecuente para la evaluación de la paternidad y requiere la evaluación de marcadores de alelos exclusivos en cada padre (es decir, no compartidos por otros machos o la hembra) entre los descendientes, sin asumir HWE. Se ha aplicado con éxito en insectos (Bretman et al., 2009; Tyler et al., 2013) y es ideal para estimar distribuciones de paternidad de grandes cantidades de descendientes simultáneamente. Nuestros análisis preliminares muestran una baja variación en las arañas, lo que sugiere algunas hipótesis alternativas no exclusivas: 1) las hembras apareadas con uno o muy pocos machos, 2) los machos apareados presentaban genotipos similares a las hembras, lo cual es muy probable en el caso de los alelos más frecuentes, y 3) si la hembra se apareó con muchos machos, entonces ella podría haber seleccionado después del apareamiento la descendencia de uno o muy pocos machos. En cualquier caso, nuestros resultados indican la viabilidad de la técnica, así como también muestran que los loci D4 seguidos por B2 serán los mejores para usar debido a su mayor variación y fundamentalmente debido a su valor PIC. Los análisis preliminares de las hembras y las arañas también sugieren que se necesitará un mayor esfuerzo experimental para acceder a los machos que presentan alelos exclusivos.

En resumen, optimizamos cuatro microsatélites para la araña donadora de regalos nupciales *P. ornata*. Estos marcadores podrían usarse para, por ejemplo evaluar la relaciones

de parentesco entre diferentes arañas o comprender las estructuración geográfica entre poblaciones estrechamente relacionadas (Brewer et al., 2014). Cualquiera de estos análisis se vería favorecido por las nuevas técnicas de secuenciación masiva, para identificar loci más útiles (Krehenwinkel et al., 2019; Parmakelis et al., 2013; Planas et al., 2014). Algunos de los marcadores son muy variables y representan una herramienta molecular potencial para los análisis de paternidad que abre caminos para comprender mejor el papel de los procesos post-copulatorios en esta especie. En este sentido, estos microsatélites serían especialmente importantes para comprender profundamente si las hembras pueden sesgar la paternidad hacia ciertos machos de acuerdo con el contenido del regalo nupcial.



Figura 1: Mapa de cuatro localidades de Uruguay donde se tomaron las muestras de *P. ornata*.

Tabla 1. Loci de microsatélites evaluados en 43 individuos de *P. ornata*. Tamaños absolutos (tamaño) y frecuencias de alelos (frecuencias); N: número de individuos utilizados; Na: número de alelos por loci; Ho: heterocigosis observada; He: heterocigosis esperada por el equilibrio de Hardy Weinberg; HWE: probabilidad de probar el equilibrio Hardy Weinberg (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Locus	Tamaño	Frecuencia	Resumen estadístico								
			N	Na	Ho	He	HWE	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-I
C1	186	0.26									
	188	0.53	43	3	0.35	0.61	***	0.53	0.82	0.67	0.23
	190	0.19									
B3	322	0.01									
	324	0.20									
	326	0.12									
	328	0.11	36	8	0.80	0.73	***	0.80	0.53	0.35	0.06
	330	0.05									
	332	0.19									
	342	0.04									
	346	0.25									
	B2	98	0.05								
102		0.01									
106		0.01									
110		0.03	40	8	0.73	0.66	***	0.59	0.76	0.61	0.19
112		0.45									
114		0.37									
116		0.06									
122		0.01									
D4	206	0.18									
	210	0.10									
	212	0.19									
	214	0.06									
	216	0.05									
	218	0.11									
	220	0.08	31	13	0.65	0.89	***	0.86	0.41	0.25	0.03
	222	0.02									
	224	0.02									
	226	0.15									
	228	0.02									
	230	0.02									
	250	0.02									
Loci combinados								0.70	0.13	0.04	0.00

Capítulo 2

Más allá del regalo nupcial: sesgo en la paternidad favorece exclusivamente a un macho en arañas.

Pandulli-Alonso I, Tomasco I & MJ Albo. (en preparación). Beyond the nuptial gift: paternity bias exclusively favors a single male in spiders.

Capítulo 2. Más allá del regalo nupcial: sesgo en la paternidad favorece exclusivamente a un macho en arañas.

Pandulli-Alonso, I.¹; I. Tomasco² & Albo, M. J.¹

¹Departamento de Ecología y Biología Evolutiva. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Montevideo, Uruguay

Resumen

Los machos de la araña *Paratrechalea ornata* producen regalos nupciales envolviendo en seda presas frescas (nutritivo) o sus restos (simbólico) y ofreciéndoselos a la hembra durante el cortejo. Las hembras son más selectivas luego del primer apareamiento y no aceptan aparearse con machos sin regalo. Por otra parte, las hembras vírgenes se aparean por similar duración con machos que ofrecen regalo nutritivo o simbólico. Asimismo, se ha sugerido que las hembras pueden reducir la paternidad de macho con regalo simbólico a través de procesos post-copulatorios. El objetivo de este trabajo fue investigar si el tipo de regalo recibido por la hembra afecta la paternidad de los machos, controlando por el orden de apareamiento. Primero, se expusieron 39 hembras a apareamientos dobles, y se crearon dos grupos experimentales: N-S, hembras que copularon primero con un macho con regalo nutritivo y segundo con un macho con regalo simbólico; S-N, hembras que copularon primero con un macho con regalo simbólico y segundo con un macho con regalo nutritivo. Los resultados mostraron que los machos con regalos simbólicos y más grandes tienen duraciones más prolongadas. Una vez que las crías emergieron se contaron y se estimó el porcentaje de paternidad a través de la técnica de “PCR competitivo por microsatélites”. En el 83% de los casos se encontró un sesgo en la paternidad hacia un solo macho, siendo uno de los pocos reportes de sesgo de paternidad exclusiva. Este sesgo no parece vincularse ni al tipo de regalo, orden o duración de apareamiento, o tamaño del macho, quedando como interrogante cual es el/los rasgos competitivos del macho y que evalúan y prefieren finalmente las hembras.

Palabras clave: elección criptica femenina, éxito reproductivo, duración de apareamiento, microsatélites.

Introducción

El término selección sexual que postuló Charles Darwin refiere a las presiones selectivas centradas en instancias pre-copulatorias (Darwin, 1871). Décadas después, el tópico tomó una dimensión más amplia comprendiéndose que la competencia entre machos para fertilizar huevos y la elección de la hembra por la pareja puede continuar luego de iniciado el apareamiento (Parker 1970; Eberhard 1996). Actualmente, se conoce que el éxito reproductivo de los individuos en numerosas ocasiones está determinado por la interacción de los procesos pre y post-copulatorios (Bretman et al., 2009; Devigili et al., 2015; McDonald et al., 2017; Péliissié et al., 2014). Por ejemplo, en gallos silvestres (*Gallus gallus*) los componentes pre y post-copulatorios covarían positivamente; los machos que tienen alto éxito adquiriendo apareamientos también tendrán alto porcentaje de paternidad (McDonald et al., 2017). Sin embargo, estas fuerzas pueden actuar en direcciones opuestas y muchas veces los machos que copulan con una hembra no obtienen necesariamente la paternidad. En tales casos, el componente post-copulatorio actúa redireccionando el éxito de los individuos (Bretman et al., 2009).

El éxito de fertilización y el porcentaje de paternidad se convirtieron en el foco principal de muchos estudios de reproducción en especies poliándricas (Eberhard, 1994; Schneider & Andrade, 2011). Cuando el sistema de apareamiento es poliándrico y especialmente con fertilización interna, el éxito de paternidad del macho no siempre se encuentra garantizado por el apareamiento y posterior transferencia de espermatozoides. Los machos pueden competir a través de sus espermatozoides dentro del tracto genital femenino (Firman et al., 2017; Parker et al., 1972; Parker & Birkhead, 2013). Asimismo, las hembras pueden en muchas ocasiones manipular crípticamente la fertilización de sus huevos, es decir, modular activamente el proceso de fertilización; incluso en presencia de adaptaciones de fertilización de los machos para monopolizar la mayor cantidad de óvulos (Vahed, 2007). Las hembras pueden, por ejemplo, desechar los espermatozoides, no ovular, no madurar los huevos (Eberhard, 1994), o sesgar el éxito según el orden de apareamiento, como se ha observado en varias especies donde se evidenciaron ventajas apreciables del segundo macho en la fertilización de los huevos (Compton et al., 1978; Schäfer et al., 2008; Schäfer & Uhl, 2002; Simmons & Siva-Jothy, 1998). Estos procesos post-copulatorios pueden finalmente reducir la probabilidad de paternidad de los machos, que en extremo puede ser descartado para la fertilización (Eberhard, 1996).

Las arañas son excelentes modelos de estudio para investigar los efectos resultantes de procesos post-copulatorios, como la elección críptica femenina. Principalmente porque las hembras a menudo se aparean con más de un macho y poseen órganos especializados para el almacenamiento de los espermatozoides (Michalik et al., 2005; Suhm & Alberti, 1993, 1996; Uhl, 1994, 2000). Las hembras adultas de las formas enteleginas tienen en el área epigástrica, una zona esclerosada y compleja llamada epigino, y a partir de allí salen canales internos de fecundación que suelen ensancharse en bolsas en donde se almacenan los espermatozoides, las espermatecas. La estructura es simétrica, conduciendo a dos canales de fecundación y espermatecas dobles (Foelix, 2011). La fertilización de los huevos se produce luego de un tiempo y próxima a la oviposición, frecuentemente cuando la hembra ya ha almacenado espermatozoides de múltiples machos (Schneider & Andrade, 2011). Varios estudios empíricos han demostrado que las hembras pueden manipular y sesgar la paternidad (Albo & Costa, 2017; Peretti & Eberhard, 2010; Schneider & Lesmono, 2009). El sesgo post-copulatorio de la hembra es aún más interesante en arañas con regalo nupcial dado que las hembras prefieren aparearse con machos que ofrecen regalo durante el cortejo pre-copulatorio (Albo & Costa, 2010; Stalhandske, 2001) y también pueden manipular los espermatozoides post-copulatoriamente (Albo et al., 2013). En la especie *Pisaura mirabilis* se observó una relación positiva entre el tiempo de apareamiento y el número de espermatozoides almacenados en el tracto genital de la hembra. Además, las hembras prefieren aparearse con machos con regalo y almacenan más espermatozoides que en apareamientos con machos sin regalo (Albo et al., 2013).

Los machos de la araña neotropical *Paratrechalea ornata* ofrecen tanto regalos nutritivos como simbólicos, pero contrariamente a lo que sucede en otras especies, las hembras no reducen el tiempo de apareamiento con machos que ofrezcan regalos simbólicos (Albo, Melo-González, et al., 2014). Sin embargo, se conoce que la fecundidad es mayor si las hembras se aparean múltiples veces con machos que donan regalos nutritivos que cuando reciben regalos simbólicos (Pandulli-Alonso et al., 2017). Se ha sugerido que las hembras

podrían sesgar post-copulatoriamente el número de espermatozoides almacenados dependiendo del contenido del regalo, ya que almacenan menos cantidad de espermatozoides cuando reciben regalos simbólicos (Albo & Peretti, 2015). Al momento se desconoce si existen sesgos en la duración del apareamiento o paternidad asignada a la descendencia por hembras que se aparean con más de un macho y reciben diferentes tipos de regalo. En este capítulo se investigó si el tipo de regalo ofrecido estuvo relacionado con la duración del apareamiento, y el posterior porcentaje de paternidad de los machos en la descendencia. A través de los marcadores moleculares (microsatélites) caracterizados para esta especie en el Capítulo 1 se examinó si en hembras que habían copulado con más de un macho existía sesgo en el porcentaje de paternidad de los machos en base al tipo de regalo ofrecido. Dada la alta selectividad por presencia de regalo de las hembras ya copuladas y que los regalos simbólicos no brindan beneficios nutricionales se espera que estas penalicen los apareamientos con machos que ofrecen este tipo de regalo, favoreciendo la paternidad hacia machos que ofrezcan regalos nutritivos. Además, la paternidad se podría ver favorecida por la duración y número de inserciones; así como por el tamaño de los machos.

Materiales y métodos

Colecta y mantenimiento de individuos

Se recolectaron individuos juveniles y subadultos, durante el período Agosto-Setiembre de 2016 y Febrero-Marzo de 2017, en zonas ribereñas del Río Santa Lucía, Departamento de Lavalleja, Uruguay (Paso del Molino: 34°16'39.78" S, 55° 14'00.61" O). Los muestreos se llevaron a cabo sobre piedras a la orilla del río, durante la noche momento de mayor actividad de la especie. Se utilizaron linternas de minero para facilitar la búsqueda por reflexión en los ojos de las arañas. Los individuos inmaduros recolectados se criaron individualmente en recipientes plásticos transparentes de 9 cm de diámetro y 7 cm de altura, con fotoperíodo natural de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a temperatura promedio de 25.0 °C (± 1.0), condiciones de laboratorio previamente establecidos para la especie (Albo et al., 2014; Pandulli-Alonso et al., 2017). Se los alimentó con moscas de la fruta (*Drosophila* sp.) dos veces por semana y se les proveyó agua *ad libitum*. Una vez que alcanzaron el estado adulto, los individuos fueron trasladados a un cuarto experimental (21.5 $\pm$ 1.5 °C) bajo el mismo régimen de alimentación durante los siguientes 15 días. Se conoce que este período es necesario para que los individuos estén receptivos para reproducirse (Klein et al., 2012). La muda de maduración en el laboratorio garantizó la virginidad de los individuos, factor relevante para establecer el éxito en el porcentaje de descendencia.

Efecto del tipo de regalo y orden de apareamiento

Se crearon dos grupos experimentales en donde las hembras fueron expuestas a apareamientos con dos machos diferentes consecutivamente. En el primer grupo la hembra (n = 18) se apareó primeramente con un macho que ofreció un regalo nutritivo (N) y en segundo lugar con un macho con regalo simbólico (S) (grupo N-S). El segundo grupo fue a la inversa, donde las hembras (n = 21) recibieron en su primer apareamiento un regalo simbólico, y en su segunda exposición un regalo nutritivo (grupo S-N). Todos los individuos fueron asignados al azar en los grupos. Las hembras fueron alimentadas con una mosca doméstica luego de cada apareamiento, los cuales se realizaron con 24 horas de diferencia y con las mismas condiciones

experimentales. Durante las experiencias fueron registradas en formato papel las características de los apareamientos: el número y duración de las inserciones palpareas, donde ocurre la transferencia espermática.

Las experiencias se realizaron en recipientes plásticos transparentes de 15 cm de diámetro y 9 cm de altura, conteniendo sustrato adecuado (piedras) que simula las condiciones naturales de su ambiente, y un recipiente con agua (4 cm de diámetro). Las mismas fueron realizadas entre las 18 y 21 horas con luz artificial, siguiendo protocolos previos (Albo et al., 2009). Se colocó a la hembra de 24 a 30 horas en la arena experimental antes de comenzar las experiencias de apareamiento para que depositaran su rastro de seda, que se conoce estimula al macho para la construcción del regalo nupcial (Albo et al., 2009). Pasado este tiempo se colocó un recipiente de vidrio sobre la hembra hacia un extremo de la arena experimental y se dispuso al macho en el otro extremo de la arena brindándole un máximo de 20 min. para sensar el territorio y realizar la construcción del regalo nupcial. Los machos fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos: los que construyeron regalos nutritivos y los que construyeron regalos simbólicos. A los machos del grupo que ofrecería regalos nutritivos (N) se les proveyó una mosca doméstica (*Musca domestica*) para que envolvieran en seda. A los machos del grupo que ofrecería regalos simbólicos (S) se les dispuso 4 mudas (exoesqueleto) de larva de *Tenebrio molitor* en el sustrato para que envolvieran con seda. Una vez el macho finalizaba la construcción del regalo se liberó la hembra permitiendo el contacto entre ambos individuos, el cortejo y el apareamiento. En los casos en que el macho no construyó el regalo durante los mencionados 20 minutos, se permitió el contacto físico con la hembra, pero se imposibilitó el apareamiento mediante la suave remoción de la hembra con un pincel. Esta exposición y la simulación de rechazo por parte de la hembra estimula al macho a construir el regalo (Albo & Costa, 2010). La hembra fue nuevamente confinada y se esperaron 20 minutos nuevamente para que el macho construyera el regalo. En los casos en que aun así la construcción del regalo no sucedió, se descartó el macho y la hembra fue re-testeada con un nuevo macho en ese momento. Esto se repitió hasta dos veces de ser necesario, de forma de poder descartar posibles incompatibilidades entre individuos.

Una vez que se alcanzaron los dos apareamientos, los machos fueron medidos con escala el ancho del cefalotórax (mm), ya que esta medida corporal es considerada un buen predictor del tamaño corporal total (Jakob et al., 1996). Luego de esto los individuos fueron sacrificados y conservados a -80°C en ultra-freezer para su posterior uso en análisis moleculares. A las hembras se las devolvió a sus respectivos recipientes individuales y se les suministró agua y comida (*Drosophila* sp.) diariamente hasta la construcción de la ooteca y eclosión de las crías. Luego de la construcción de la ooteca los recipientes con las hembras fueron colocadas bajo 4 bombitas de luz (60W) que les aumentó la luminosidad y la temperatura (28.0 ± 1.0 °C) durante tres horas (de 13 - 16 horas), técnica usada para optimizar la emergencia de la descendencia en otras y estas arañas (Albo et al., 2012; 2011; Pandulli-Alonso et al., 2017). Se registró la fecha de construcción de la ooteca y la de emergencia de las crías. Una vez eclosionadas las crías, éstas fueron contabilizadas y se preservaron a -80°C en ultra-freezer para su posterior uso en los análisis moleculares. Al igual que con los machos, se midió el tamaño corporal de las hembras y también se preservaron a -80°C para análisis de moleculares. La comparación de las características generales de los individuos, como tamaño

y edad no mostraron diferencias significativas ni en machos ni en hembras (material suplementario: Tabla 1S).

Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete R (Core 2013). Todas las variables fueron sujetas a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas utilizando los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. En la comparación entre grupos (N-S y S-N) se utilizó ANOVA para aquellas variables con distribución gaussiana y Kruskal-Wallis para las variables que no cumplieron con dicha distribución. Se utilizaron Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución gaussiana y poisson para examinar como el tipo de regalo y el orden de apareamiento afectan la duración de apareamiento y número de inserciones, respectivamente. Los modelos iniciales incorporaron tipo de regalo y el orden de apareamiento en interacción y el tamaño de machos y hembras como efectos fijos. El tamaño de los machos fue incluido dado que se ha reportado que macho más pequeños son proclives a producir regalos simbólicos (Albo et al, en revisión), mientras que el tamaño de las hembras se conoce puede afectar el cortejo del macho (Gaskett, 2007). La latencia de oviposición, latencia de emergencia de las crías y número de crías se analizaron a través de GLMs con distribución gamma para las primeras dos y poisson para la última. Estos incorporaron el grupo experimental, duración de apareamiento, y los tamaños de machos y hembras como efectos fijos. Todos los modelos fueron simplificados utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) con $\Delta AIC > 2$ criterio hasta llegar el modelo más parsimonioso (Bolker, 2007). La paternidad fue codificada como 1 o 0 y se examinó a través de un GLM con distribución binomial utilizando como variables fijas el tipo de regalo, orden de apareamiento, duración de apareamiento y tamaño del macho. Se realizaron modelos independientes para cada variable debido al bajo número de muestra. El nivel de significancia fue considerado en $\alpha = 0.05$.

Estimación de paternidad de apareamientos dobles

La cantidad de individuos analizados para investigar la paternidad fue menor a la cantidad de individuos utilizados para los experimentos de comportamiento debido a que el resto de las hembras murieron antes de producir huevos o produjeron huevos que no eclosionaron. Se realizaron las extracciones de ADN total a partir de patas de $n = 39$ individuos adultos ($n = 13$ hembras y $n = 26$ machos) provenientes de los experimentos comportamentales ($n = 8$ tríadas de N-S; $n = 5$ tríadas del S-N) según protocolo modificado de Miller et al. (1988). Luego se realizó la cuantificación de la concentración ADN de las extracciones en nanodrop (NANADROP LITE Spectrophotometer, Thermo Scientific) y se hicieron diluciones para obtener una concentración de aproximadamente 4 ug/ul para una correcta reacción en cadena de la polimerasa (PCR) posterior. Se amplificaron los cuatro marcadores microsátélites optimizados en el Capítulo 1 (B2, B3, C1 y D4) (Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009). La reacción tuvo un volumen final de 10 μ l, que contenía 0.1 μ l de Taq Polimerasa, 1 μ l de Buffer, 0.8 μ l de MgCl₂ (25mM) 0.2 μ l de cada primer a 10mM (Forward y reverse), 0.2 μ l de dNTPs conteniendo 10mM de cada nucleótido, 2.5 μ l de agua y 5 μ l de ADN. Las condiciones del ciclado fueron las siguientes: 95°C por 3 minutos, a lo que le siguieron 35 ciclos de 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 56°C por 30 segundos de asociación y 72°C por 30 segundos de extensión, y finalmente la extensión a 72°C por 5 minutos. En todos los casos, el primer forward de cada par fue marcado con el fluorocromo FAM. Los productos amplificados se

sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 5% durante 20 minutos a 170V, y luego se visualizaron mediante tinción con plata modificado de Sanguinetti et al. (1994). El tamaño de los productos de PCR se estimó por comparación con un marcador de peso molecular conocido de 100bp (RAINBOW Bioron) y las amplificaciones exitosas fueron enviadas al servicio de Análisis de fragmentos de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Insitut Pasteur de Montevideo. Allí las muestras fueron corridas en un ABI3500 Genetic Analyzer, con la matriz DS-33 y con Liz600 como estándar de tamaño. Los archivos resultantes fueron analizados con el programa PeakScannerv2 (Applied Biosistem), anotando para cada muestra el tamaño absoluto de los alelos encontrados para cada loci (Figura 1). Basado en los resultados del Capítulo 1, se utilizó el marcador D4 que el más variables para los análisis de paternidad de los apareamientos dobles.

Asimismo, la muestra volvió a reducirse dado que dentro de los individuos analizados y por requerimientos de la técnica del PCR competitivo se utilizaron solo las tríadas en que los machos involucrados mostraron al menos un alelo exclusivo (no compartido con el otro macho, ni con la hembra) (i.e.: $n = 5$ tríadas de N-S; $n = 1$ tríadas del S-N). De estas tríadas se procedió a la extracción de ADN de las crías con kit de extracción invitrogen (PureLink™ Genomic DNA mini kit) para garantizar la calidad del ADN aislado. Luego se siguió con los mismos procedimientos y protocolos utilizados para los individuos adultos mencionados anteriormente.

Resultados

Efecto del tipo de regalo y orden de apareamiento

En el Tabla 1S del material suplementario se encuentran los datos para duración de apareamiento, número de inserciones, latencia de oviposición, latencia en emergencia de las crías y número de crías.

El GLM mostró que la duración del apareamiento fue diferente según el tipo de regalo que ofreció el macho, presentando los machos con regalos simbólicos siempre apareamientos más prolongadas. También hubo efecto del tamaño del macho, teniendo los machos más grandes apareamientos más largos (Tabla 1, Figura 2). El orden de apareamiento no afectó la duración de la misma. No se encontraron diferencias en el número de inserciones ni por el tipo de regalo, orden de copula o tamaño de los individuos (Tabla 1).

La latencia de oviposición y la latencia de emergencia de las crías no fueron afectadas ni por el grupo (N-S; S-N) ni por el tamaño de los individuos. Mientras que, el número de crías aumentó positivamente tanto con el tamaño de la hembra, así como marginalmente con la duración del apareamiento (Tabla 2, Figura 3).

Estimación de paternidad de apareamientos dobles

Los genotipos de los adultos incluidos en los apareamientos dobles y de su descendencia se muestran en la Tabla 3. En 5 de las 6 tríadas finalmente analizadas, se pudo observar un sesgo en la paternidad de la descendencia, mientras que en la restante tríada (i.e.: con la hembra 3156), es posible asignar paternidad a uno de los machos y no es posible descartar ni asignarle paternidad al otro. Los datos mostraron que las hembras sesgan la paternidad de la primera camada de crías, lo que se verificó en el 83% de los casos. En 4 de los 6 casos analizados, la

paternidad se vio representada por un solo macho, pudiendo excluir de la paternidad al otro. En el caso de la tríada con la hembra número 3161, todos los individuos involucrados presentaron alelos exclusivos por lo cual fue simple la lectura de la paternidad. Y en el caso de tríadas con las hembras número 3153, 3231 y 3158, ambos machos tienen al menos un alelo exclusivo, por lo que es posible excluir de la paternidad a uno de ellos ya que en las crías no está presente su alelo exclusivo. En el caso de la tríada con la hembra 3216, uno de los machos presenta un genotipo idéntico a la hembra, por lo cual no se puede excluir su participación como padre, pero la concentración del alelo exclusivo del otro macho es tan elevada, que i) asegura su participación y ii) sugiere que ésta fue mucho mayor que la del primero, en caso de que haya participado. Algo diferente ocurre en el caso de la tríada de la hembra 3156: en este caso podemos afirmar que el segundo macho contribuye a la paternidad porque sus alelos exclusivos están presentes en la descendencia, pero no podemos descartar al primero porque tiene el mismo genotipo de la hembra (Tabla 3). Por otro lado, no se encontró una relación (GLM) entre este sesgo en la paternidad con el tipo de regalo (nutritivo/simbólico), la duración del apareamiento o el tamaño del macho (Tabla 4, Figura 4).

Discusión

El presente trabajo sugiere la existencia de procesos post-copulatorios, en particular la posibilidad de elección críptica femenina en la araña *Paratrechalea ornata*. Se encontró un sesgo total de la paternidad a favor de uno de los dos machos con los que se había apareado. Si bien este resultado está basado en un número de muestra bajo, se verifica en todos los casos donde se contó con alelos exclusivos en ambos machos. Esto concuerda con resultados de estudios previos que sugieren que las hembras pueden manipular crípticamente el número espermatozoides almacenados (Albo & Peretti, 2015). Previo a la oviposición las arañas generalmente poseen un intervalo de 30 días aproximadamente durante el cual se producen múltiples apareamientos (Drengsgaard & Toft, 1999) y luego ocurre la fertilización de los huevos (Foelix, 1996). La posibilidad de las hembras de aparearse con varios machos, y almacenar sus espermatozoides promueve la posibilidad de elección críptica femenina, así como la existencia de competencia espermática dentro del tracto genital de la hembra.

La utilización no aleatoria de espermatozoides de un macho particular se denomina prioridad de los espermatozoides, y generalmente se ha explicado como una consecuencia de la estratificación de espermatozoides dentro del órgano de almacenamiento de la hembra (Austad, 1984; Simmons & Siva-Jothy, 1998). En arañas, teóricamente se sostiene que durante el apareamiento los espermatozoides de las especies haploginas ingresan al interior de la espermateca por un único conducto y que estos salen al exterior durante la oviposición nuevamente por el mismo conducto. Esto determina que los machos que copulan últimos tendrán la prioridad de acceso a la fertilización de los óvulos. En las enteleginas, por otro lado, tienen conducto unidireccional, que consiste en un conducto de apareamiento que llega a la espermateca y un conducto de fertilización a través del cual los espermatozoides llegan a los óvulos para la fertilización. Esto significa que los machos que se aparean primero tendrán prioridad espermática. Sin embargo, esto no siempre se cumple, como por ejemplo en la araña *Pisaura mirabilis* que tiene genitalia de tipo entelegina, verificaron un sesgo en la paternidad de un 70-75% hacia el primer macho, utilizando la técnica de macho estéril. Pero observaron que cuando la hembra copulaba con 4 machos, los machos tardíos en el orden de

apareamiento (4tos) obtenían una gran proporción de las fertilizaciones (24%), especialmente si la duración del apareamiento excedía a la de los machos anteriores. Por lo tanto, las hembras de esa especie pueden utilizar los espermatozoides de más de un macho cuando se aparean con dos o más y el sesgo en la paternidad de las crías dependerá del número de apareamientos (Drengsgaard & Toft, 1999). Si bien en *P. ornata* quedan por conocer los patrones de prioridad espermática, el presente estudio demuestra por primera vez que las hembras pueden utilizar los espermatozoides de un solo macho, al menos cuando suceden dos apareamientos.

Contrario a lo esperado, el porcentaje de paternidad de las crías no pareció verse afectado por el tipo de regalo. Además, si bien se encontró que la duración del apareamiento se vio afectada positivamente por la presencia de regalo simbólico y el tamaño del macho, tampoco se encontró efecto de estas características sobre la paternidad. El hecho de que el tipo de regalo parece no ser un factor clave para la determinación de la paternidad suma evidencia en relación a la falta de discriminación de las hembras entre ambos tipos de regalo ya sea durante el cortejo como en el apareamiento. Esto podría explicar la alta frecuencia de regalos simbólicos reportada para las distintas poblaciones naturales de la especie (entre 45-96%) (Albo et al. en revisión). A diferencia de muchas especies donadoras de regalos nupciales, se ha sugerido que las hembras de *P. ornata* no utilizarían los múltiples apareamientos como una estrategia de forrajeo (Pandulli-Alonso et al., 2017). Al parecer las hembras no pueden reconocer el contenido del regalo durante el cortejo pre-copulatorio (Albo et al., 2014; Pandulli-Alonso et al., 2017). Al contrario de lo que sucede en otras especies (Albo et al., 2011), tampoco reducen el tiempo de apareamiento con aquellos machos que ofrecen regalos simbólicos (Albo et al., 2014). De hecho, en el presente trabajo los machos con regalo simbólico obtuvieron mayores duraciones de apareamientos en relación a aquellos que ofrecieron regalo nutritivo, similar a lo reportado por Albo y Peretti (2015). Más allá del contenido del regalo, los machos más grandes y que producen regalos simbólicos invierten mucho más en envolturas en seda que con los regalos nutritivos (Pandulli-Alonso datos no publicados), lo que implica costos en tiempo y energía que podrían ser un indicador honesto de la calidad del macho. Esto significa que invertir en envoltura de seda puede ser una posible estrategia de los machos cuando ofrecen regalos simbólicos, para compensar la falta de contenido y aun así maximizar su éxito reproductivo como ha sido sugerido para otras especies (Ghislandi et al., 2014). De esta forma, o bien las hembras estarían eligiendo a los machos con regalo nupcial ya sea por el contenido como por la envoltura, y/o los machos más grandes son también más competitivos a nivel espermático.

Se conoce que una de las características más importantes para el éxito del apareamiento del macho es el tamaño corporal (Andersson, 1994). En muchas especies, los machos más grandes dominan en la competencia directa sobre el acceso a las hembras, o las hembras muestran preferencias por los machos más grandes porque su tamaño corporal puede estar relacionado con la calidad fenotípica o genética (Andersson, 1994; Blanckenhorn, 2000; Johnstone, 1995). En *P. ornata* el tamaño de la hembra afecta positivamente el número crías. Sumado, se encontró que el número de crías también aumenta marginalmente con la duración de apareamiento. Ya son conocidas las correlaciones positivas entre la duración de apareamiento y la proporción de crías nacidas (Schneider & Andrade, 2011; Simmons, 2001;

Stalhandske, 2001). En cuanto a la hembra, obtuvimos un resultado esperable, dado que la fecundidad se relaciona con el tamaño de la hembra, ya que esto determina el número, tamaño y supervivencia de la descendencia, al menos en la mayoría de los ectotermos (Honek, 1993; Stearns, 1992).

En resumen, este trabajo evidencia un fuerte sesgo de la paternidad en la especie *P. ornata*. Sorprendentemente, el mismo resulta en su totalidad a favor de uno de los dos machos con los que se aparean, siendo uno de los pocos ejemplos en la literatura. Dado que ese sesgo en la paternidad no parece estar determinado por el tipo de regalo, para los machos ofrecer un regalo nutritivo o simbólico redundaría en igual éxito reproductivo. Sería valioso determinar los costos que tiene para el macho realizar uno u otro tipo de regalo para avanzar en el conocimiento de la estrategia reproductiva de esta especie.

Tabla 1: Parámetros estimados, error estándar, t valor y p valor resultantes de Modelos Generalizados Lineales (GLM) con distribución gaussiana y Poisson para explicar diferencias en la duración de apareamiento y el número de inserciones, respectivamente, de acuerdo con el tipo de regalo (nutritivo/simbólico), el tamaño de machos y hembras. Los p-valores significativos se muestran remarcados en negrita

variable respuesta	variables predictoras	Estimado	Error std	Estadístico	p-valor
Duración de apareamiento	(intercepto)	-4.660	3.424	-1.363	0.192
	Tipo de regalo	0.941	0.364	2.584	0.019
	Tamaño macho	1.783	0.506	3.523	0.002
	Tamaño hembra	-0.465	0.626	-0.743	0.468
Número de inserciones	(intercepto)	-1.951	3.119	-0.626	0.532
	Tipo de regalo	0.161	0.416	0.387	0.699
	Orden apareamiento	-0.119	0.424	-0.281	0.779
	Tamaño macho	0.705	0.450	1.566	0.117
	Tamaño hembra	-0.057	0.503	-0.115	0.908
	Tipo regalo*Orden apareamiento	0.208	0.607	0.343	0.732

Tabla 2: Parámetros estimados, error estándar, t valor y p valor resultantes de Modelos Generalizados Lineales (GLM) con distribución gamma para la latencia de oviposición y latencia de emergencia de las crías, y Poisson para el número de crías, de acuerdo con los grupos experimentales, la duración de apareamiento y los tamaños de machos y hembras. Los p-valores significativos se muestran remarcados en negrita.

variable respuesta	variables predictoras	Estimado	Error std	Estadístico	p-valor
Latencia de oviposición	(intercepto)	0.018	0.041	0.437	0.669
	Grupo exp. N-S/S-N	-0.001	0.004	-0.325	0.750
	Tamaño macho N/Tamaño macho S	-0.001	0.005	-0.134	0.895
	Tamaño hembra	0.010	0.007	1.387	0.187
Latencia de emergencia	(intercepto)	0.020	0.004	5.719	< 0.0001
	Grupo exp. N-S/S-N	-0.001	0.001	-1.694	0.111
	Tamaño macho N/Tamaño macho S	0.001	0.001	1.528	0.147
Número de crías	(intercepto)	-0.546	0.692	-0.789	0.429
	Duración de apareamiento	0.006	0.035	1.849	0.064
	Tamaño macho N/Tamaño macho S	0.123	0.103	1.192	0.234
	Tamaño hembra	0.866	0.117	7.372	< 0.0001

Tabla 3: Genotipo de los adultos y alelos presentes en el conjunto de la descendencia producto del apareamiento doble de éstos, para el locus D4 en *Paratrechalea ornata*. El orden de apareamiento fue siempre regalo nutritivo seguido por regalo simbólico, salvo en * que fue a la inversa. Abreviaciones: N, regalo nutritivo; S, regalo simbólico; subrayado, macho que aporta más a la descendencia; negritas, alelos exclusivos de los machos; ?, asignación no confirmada.

No hembra	Genotipo hembra	Genotipo 1 ^{er} macho	Genotipo 2 ^{do} macho	Genotipo Crías	Paternidad
3161*	210/210	212/212	206/216	206/210/216	2N
3153	206/206	214/210	210/ 208	206/ 208 /210	2S
3156	206/208	206/208	210/216	206/208/ 210/216	2S/1N?
3216	206/212	206/212	212/ 216	206/212/ 216	<u>2S</u> /1N?
3231	210/212	212/ 220	206/212	210/212/ 220	1N
3158	206/210	206/ 208	206/ 216	206/ 208 /210	1N

Tabla 4: Parámetros estimados, error estándar, z-valor y p-valor resultantes de Modelos Generalizados Lineales (GLM) de los porcentajes de paternidad (distribución binomial) en relación a A) el tipo de regalo aportado por el macho con el que la hembra ha copulado (nutritivo/simbólico), B) la duración de apareamiento (min) y C) el tamaño del macho (mm).

Variable respuesta	Variable predictora	Estimado	Error std	Estadístico	p-valor
Paternidad	(intercepto)	0.406	0.913	0.444	0.657
	Tipo de regalo	0.000	1.291	0.000	1.000
	(intercepto)	1.175	1.200	0.979	0.327
	Duración de apareamiento	-0.489	0.6376	0.767	0.443
	(intercepto)	3.043	10,754	0.283	0.777
	Tamaño de macho	-0.5618	2.377	-0.236	0.813

Figura 1: Cromatograma mostrando señal de microsatélites amplificados para el locus D4 en *Paratrechalea ornata*. El eje de las x corresponde a pares de bases y el eje de las y a la intensidad de la fluorescencia. La línea roja es la curva que se utiliza para determinar el tamaño de fragmentos desconocidos. Se muestra el tamaño de los alelos de acuerdo a un estándar de tamaño para la tríada con la hembra número 3161. A) hembra 3161 (210/210), B) primer macho que copuló con la hembra (212/212), C) segundo macho que copuló con la hembra (206/216), D) crías de hembra 3161 (206/210/216). En la imagen B aparecen bandas rosadas debido a que esa muestra quedó algo saturada.

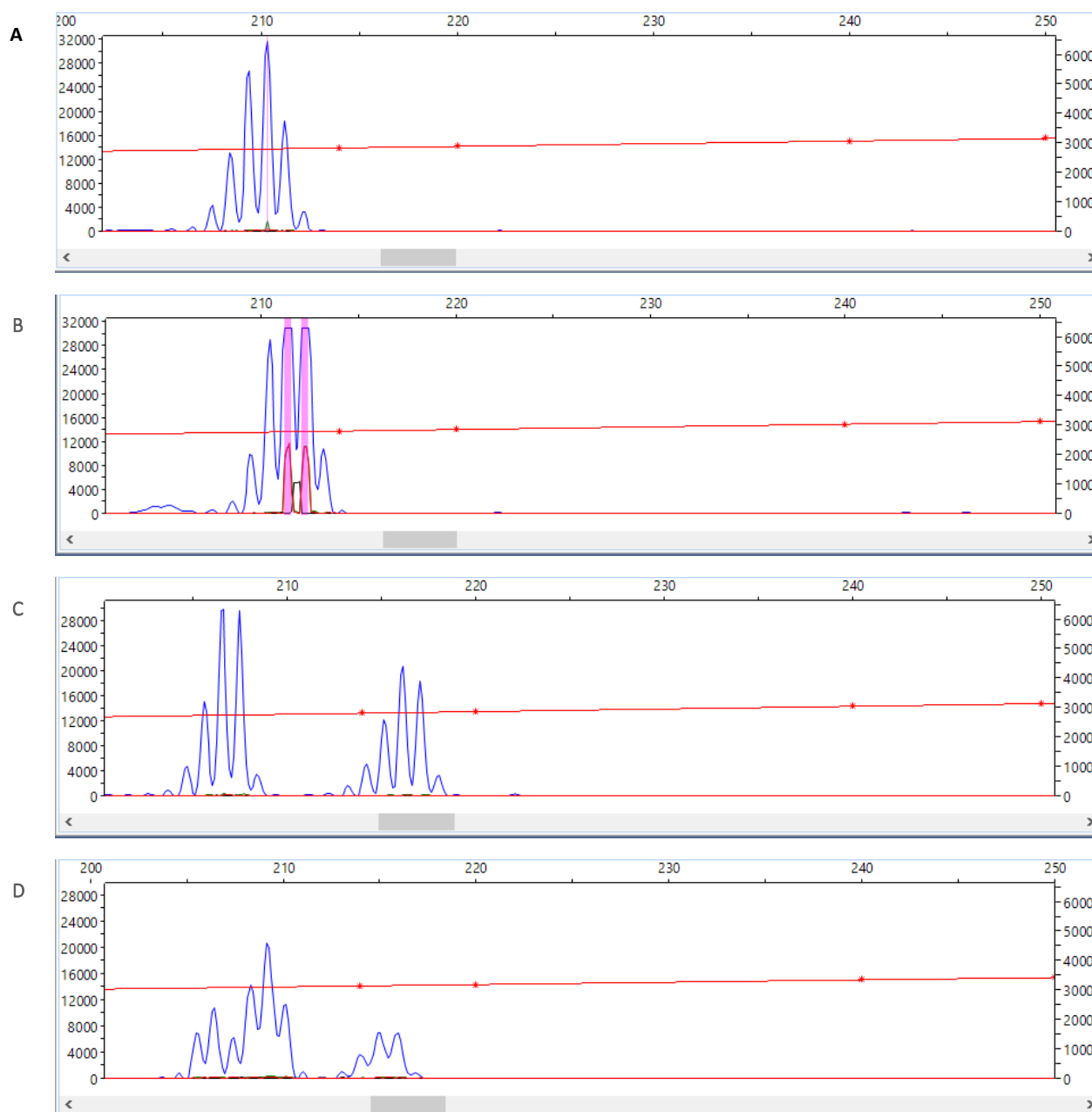


Figura 2: Efecto del tamaño del macho y el tipo de regalo sobre la duración de apareamiento (N: regalo nutritivo; S: regalo simbólico).

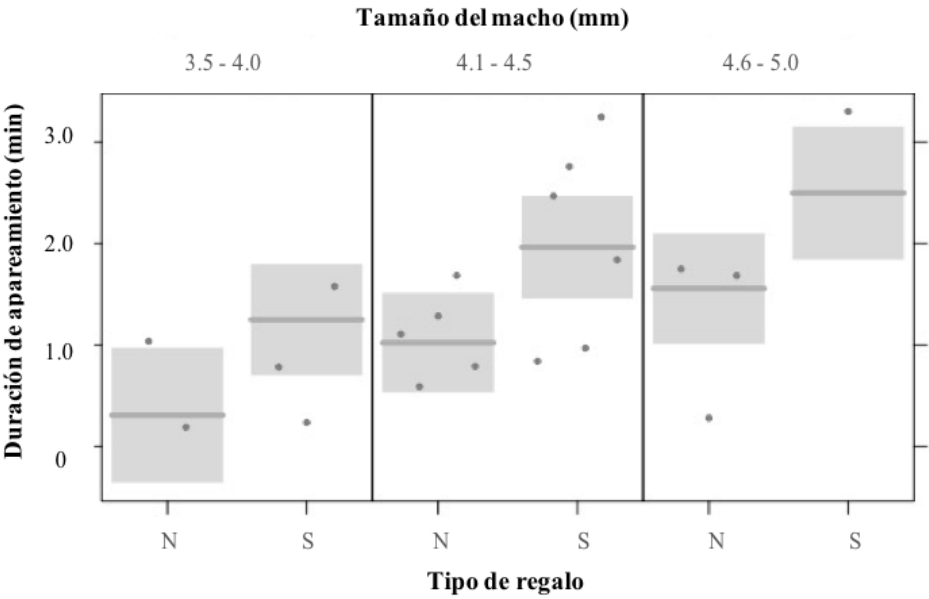


Figura 3: Efecto del tamaño de la hembra y la duración del apareamiento sobre el número de crías.

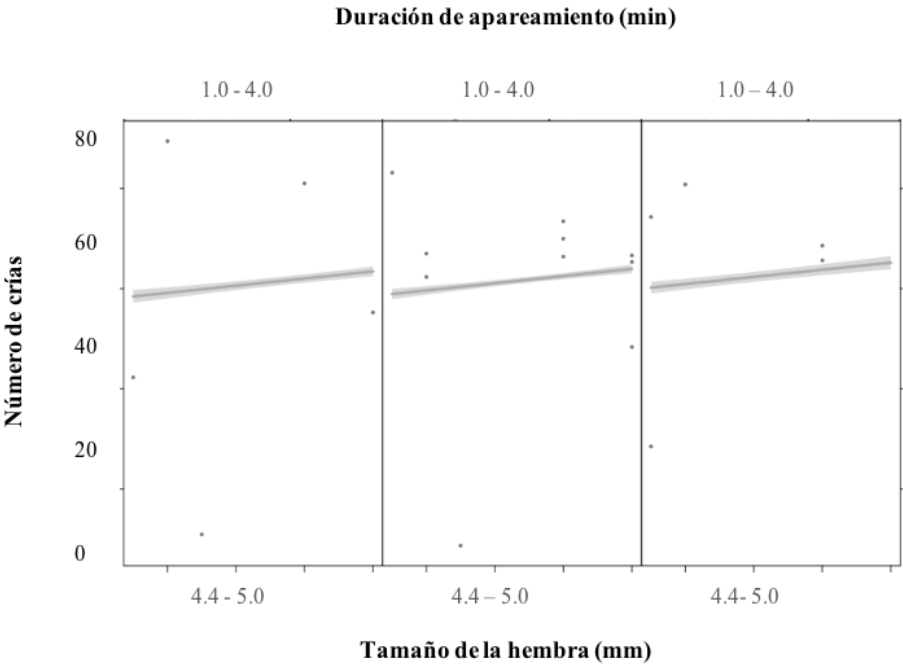
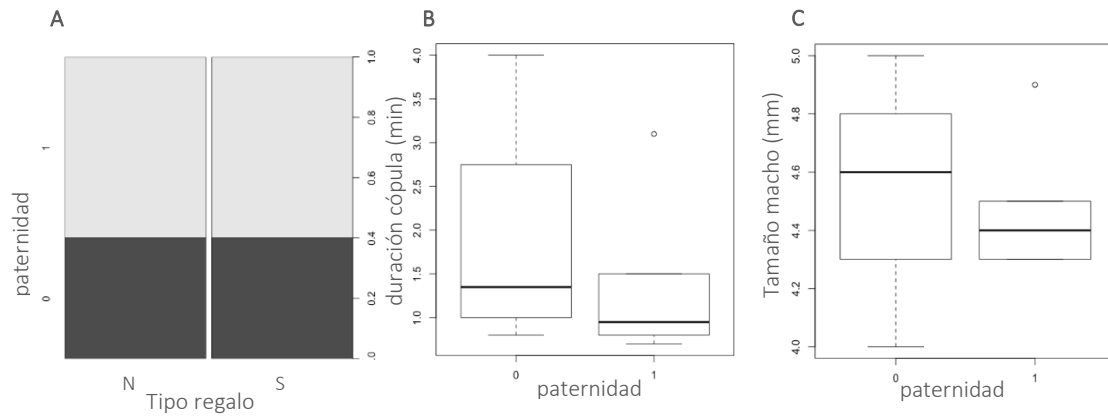


Figura 4: Ocurrencia (0/1) de paternidad correspondiente a los machos que copularon con hembras de *Paratrechalea ornata*: A) según el tipo de regalo ofrecido por el macho a la hembra (nutritivo/simbólico), B) según la duración de apareamiento (min) y C) según el efecto del tamaño del macho (mm).



Consideraciones finales

Los sistemas de apareamiento con regalo nupcial y en particular el caso de las arañas, el origen evolutivo del regalo se supone que fue del tipo nutritivo con un evidente beneficio para ambos sexos (Albo et al., 2017). Para las hembras, obtener más nutrientes incrementa el número de huevos (fecundidad) y de hecho se ha sugerido que la poliandria en estas especies se mantiene por beneficios directos (Arnqvist & Nilsson, 2000; Toft & Albo, 2015). Por otro lado, para los machos ofrecer un regalo nupcial le confiere mayor oportunidad y duración de apareamiento y mayor número de descendientes (Albo & Costa, 2010; Stalhandske, 2001; Vahed et al., 1998). Una vez establecido el rasgo, algunos machos (por ejemplo, aquellos con menor condición corporal) comenzaron a consumir el regalo previo a su envoltura en seda, modificando de esta forma su contenido. Los regalos simbólicos parecen haber surgido como una táctica alternativa de apareamiento para aquellos machos con menor calidad de atributos (Albo et al., 2009, 2011). Las tácticas alternativas de apareamiento son variantes discretas de un comportamiento que desarrollan los individuos dentro de una población, en función de maximizar su éxito reproductivo (Brockmann, 2001; Gross, 1996; Taborsky et al., 2008). Generalmente los machos más competitivos y con mejor condición corporal son los que llevan adelante la táctica dominante, y eso se relaciona con el mayor éxito reproductivo. Los individuos que no satisfacen los costos que impone la táctica dominante, realizarán la táctica alternativa y tendrán un menor éxito reproductivo.

Sin embargo, todos los estudios realizados al momento, incluyendo los resultados encontrados en esta tesis, ponen en duda la clasificación de táctica alternativa de apareamiento para los regalos simbólicos en la especie *P. ornata*. Esto es porque 1) diferentes poblaciones de la especie poseen diferentes porcentajes de regalos simbólicos, llegando al extremo de un 96% (Albo et al. en revisión), 2) las hembras no penalizan el regalo simbólico frente al nutritivo ni en aceptación o duración del apareamiento (Albo et al., 2014), 3) las hembras no incurren en múltiples apareamientos para forrajear (Pandulli-Alonso et al., 2017), 4) el sesgo en la paternidad no está asociado al tipo de regalo (este estudio). Estas consideraciones vuelven a la especie neotropical un interesante modelo para estudiar evolución del comportamiento y en particular ahondar en los potenciales procesos post-copulatorios.

Perspectivas

Las arañas son excelentes modelos de estudio para investigar temas referidos a la elección críptica femenina, porque son poliándricas (Schneider & Andrade, 2011), con fecundación interna y porque pueden sesgar la paternidad como se demuestra en el Capítulo 2.

El reciente empleo de marcadores moleculares hipervariables en arácnidos ha dado paso a técnicas para el análisis de la paternidad en poblaciones naturales y experimentales, abriendo un nuevo camino de conocimiento. En este sentido, los microsatélites son marcadores poderosos para analizar las tasas de apareamiento y el éxito de la paternidad. Si bien su aislamiento es laborioso, los microsatélites ahora pueden aislarse más fácilmente en muchas especies (Castoe et al., 2010; Malausa et al., 2011). Por lo tanto, aunque se han utilizado rara vez para los arácnidos (Brewer et al., 2014), los microsatélites están disponibles para un número creciente de especies de arañas (Bilde et al., 2009; Esquivel-Bobadilla et al., 2013; Hataway et al., 2011; Parmakelis et al., 2013; Planas et al., 2014; Rütten et al., 2001; Tieppo Da Silveira & Bonatto, 2009). Por lo cual sería ideal aislar marcadores específicos para la especie modelo *Paratrechalea ornata*. Esto sin duda podrá realizarse a mediano plazo de forma de obtener microsatélites específicos más variables, que permitan mejorar la asignación de la paternidad a un mayor conjunto de tríadas y con menor incertidumbre.

De esta forma, una vez identificados los marcadores específicos, sería conveniente realizar nuevos experimentos considerando el diseño experimental realizado en el Capítulo 2 y además considerar otros comportamientos posiblemente implicados en el sesgo de paternidad observado. Por ejemplo, existe una instancia poco observada y analizada que parece tener incidencia en la elección críptica de la hembra y finalmente en el éxito reproductivo, que es el cortejo copulatorio (Eberhard, 1996). Durante el cortejo y el apareamiento se puede observar que los machos realizan golpeteos sobre el cuerpo de la hembra. Esto tal vez sea algo parecido al movimiento llamado *tapping* que se observa en otros animales, un golpeteo repetido sobre los genitales externos que conduce al movimiento de espermatozoides favoreciendo a ese macho en la paternidad (Otronen & Silva-Jothy, 1991; Peretti & Eberhard, 2010). Sería de gran interés cuantificar esta situación y evaluar la relación al éxito reproductivo. Tal vez sea esta una variable sobre la que la hembra realiza la elección críptica, por lo que realizar experimentos controlando este comportamiento podría evidenciar su efecto.

Referencias bibliográficas

- Albo, M. J., Bilde, T., & Uhl, G. (2013). gifts Sperm storage mediated by cryptic female choice for nuptial Subject collections Sperm storage mediated by cryptic female choice for nuptial gifts. *Proc. R. Soc. B*, 280(20131735), 1–6. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1735>
- Albo, M. J., Costa-Schmidt, L. E., & Costa, F. G. (2009). To feed or to wrap? Female silk cues elicit male nuptial gift construction in a semiaquatic trechaleid spider. *Journal of Zoology*, 277(4), 284–290. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00539.x>
- 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(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.01.018>
- Albo, M. J., & Costa, F. G. (2017). Female wolf spiders exert cryptic control drastically reducing ejaculate size. *Ethology*, 123(9), 659–666. <https://doi.org/10.1111/eth.12640>
- 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(4), 993–1000. <https://doi.org/10.1093/beheco/arz040>
- Albo, M. J., Macías-Hernández, N., Bilde, T., & Toft, S. (2017). Mutual benefit from exploitation of female foraging motivation may account for the early evolution of gifts in spiders. *Animal Behaviour*, 129, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.05.001>
- 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*. 92, 25–31.
- Albo, M. J., Pavón-Peláez, C., Franco-Trecu, V., & Naya, D. (n.d.-a). Contrasting environmental conditions drive divergence of deceptive alternative mating tactics. *Proceedings of the Royal Society B*.
- Albo, M. J., Pavón-Peláez, C., Franco-Trecu, V., & Naya, D. (n.d.-b). Contrasting environmental conditions drive divergence of deceptive alternative mating tactics. *Scientific Reports*.
- Albo, M. J., & Peretti, A. V. (2015). Worthless and nutritive nuptial gifts: Mating duration, sperm stored and potential female decisions in spiders. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129453>
- Albo, M. J., Toft, S., & Bilde, T. (2012). Female spiders ignore condition-dependent information from nuptial gift wrapping when choosing mates. *Animal Behaviour*, 84(4), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.07.014>
- Albo, M. J., Toft, S., & Bilde, T. (2014). Sexual selection, ecology and evolution of nuptial gifts in spiders. In *Selection sexual: Perspectives and models from the neotropics*.
- Albo, M. J., Winther, G., Tuní, C., Toft, S., & Bilde, T. (2011). *Worthless donations : male deception and female counter play in a nuptial gift-giving spider*.
- Alcock, J. (1994). Associations between males and females in hypothesis. *Annual Review of Entomology*, (62), 1–21.
- Andersen, T., Bollerup, K., Toft, S., & Bilde, T. (2008). *Why Do Males of the Spider Pisaura mirabilis Wrap Their Nuptial Gifts in Silk : Female Preference or Male Control ?* 775–781. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01529.x>
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press.
- Arnqvist, R. A. N., & Nilsson, T. (2000). *The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects*. 145–164. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1446>
- Austad, N. S. (1982). First Male Sperm Priority in the Bowl and Doily Spider , *Frontinella pyramitela* (Walckenaer). *Evolution*, 36(4), 777–785.
- Austad, N. S. (1984). Evolution of sperm priority patterns in spiders. In *Sperm competition and the evolution of animal mating systems* (pp. 223–249).
- Awad, M., Laugier, G. J. M., & Oldr, A. L. (2015). *Unbalanced polyandry in wild - caught ladybirds Harmonia axyridis (Coleoptera : Coccinellidae)*. 427–434. <https://doi.org/10.1007/s13355-015-0348-5>
- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Archiv Für Elektrotechnik*, pp. 349–368. <https://doi.org/10.1007/BF01407191>
- Bilde, T., Tuní, C., Cariani, A., Santini, A., Tabarroni, C., Garoia, F., & Goodacre, S. L. (2009). Characterization of microsatellite loci in the subsocial spider *Stegodyphus lineatus* (Araneae: Eresidae). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 128–130. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02296.x>
- Bilde, T., Tuní, C., Elsayed, R., Pekar, S., & Toft, S. (2006). *Nuptial gifts of male spiders : sensory exploitation of the female ' s maternal care instinct or foraging motivation ?* (Clerck 1757), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.05.014>
- Bjork, A., & Pitnick, S. (2006). Intensity of sexual selection along the anisogamy-isogamy continuum. *Nature*, 441(7094), 742–745. <https://doi.org/10.1038/nature04683>
- Blanckenhorn, W. U. (2000). The evolution of body size: What keeps organisms small? *The Quarterly Review of Biology*, 75(4), 385–407.

- Bolker, B. (2007). *Ecological Models and Data in R. P. in: Princeton University Press, Princeton.*
- Bretman, A., Newcombe, D., & Tregenza, T. (2009). Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. *Molecular Ecology*, 18, 3340–3345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04301.x>
- Brewer, M. S., Cotoras, D. D., Croucher, P. J. P., & Gillespie, R. G. (2014). New sequencing technologies, the development of genomics tools, and their applications in evolutionary arachnology. *Journal of Arachnology*, 42(1), 1–15. <https://doi.org/10.1636/m13-78.1>
- Bristowe, W. S. (1958). *World of spiders.*
- Brockmann, H. J. (2001). The evolution of alternative strategies and tactics. *Advances in the Study of Behavior*, 30, 1–51. [https://doi.org/10.1016/s0065-3454\(01\)80004-8](https://doi.org/10.1016/s0065-3454(01)80004-8)
- Burger, M. (2010). Complex female genitalia indicate sperm dumping in armored goblin spiders. *Zoology*, 113(1), 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2009.04.002>
- Bussiere, L. F., Demont, M., Pemberton, A. J., Hall, M. D., & Ward, P. I. (2010). The assessment of insemination success in yellow dung flies using competitive PCR. *Molecular Ecology Resources*, 10, 292–303. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02754.x>
- Carico, J. E. (2005). Descriptions of Two New Spider Genera of Trechaleidae (Araneae, Lycosoidea) From South America. *Journal of Arachnology*, 33(3), 797–812. <https://doi.org/10.1636/h03-71.1>
- Castoe, T. A., Poole, A. W., Gu, W., Jason de Koning, A. P., Daza, J. M., Smith, E. N., & Pollock, D. D. (2010). Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 341–347. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02750.x>
- Christenson, T. E., & Cohn, J. (1988). Male advantage for egg fertilization in the golden orb-weaving spider (*Nephila clavipes*). *Journal of Comparative Psychology*, 102(4), 312–318. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.102.4.312>
- Compton, M. M., Van Krey, H. P., & Siegel, P. B. (1978). The filling and emptying of the uterovaginal sperm-host glands in the domestic hen. *Poultry Science*, 57(6), 1696–1700. <https://doi.org/10.3382/ps.0571696>
- Costa-Schmidt, L. E., & Carico, J. E. (2008). *Nuptial gifts and sexual behavior in two species of spider (Araneae , Nuptial gifts and sexual behavior in two species of spider (Araneae , Trechaleidae , Paratrechalea).* (September). <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0379-7>
- Danielson-François, A., Hou, C., Cole, N., & Tso, I. M. (2012). Scramble competition for moulting females as a driving force for extreme male dwarfism in spiders. *Animal Behaviour*, 84(4), 937–945. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.07.018>
- Darwin, C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex.* London: J Murray. 1, 423.
- Dean, R., Nakagawa, S., Pizzari, T., Dean, R., Nakagawa, S., & Pizzari, T. (2011). *The Risk and Intensity of Sperm Ejection in Female Birds.* 178(3), 343–354. <https://doi.org/10.1086/661244>
- Devigili, A., Evans, J. P., Di Nisio, A., & Pilastro, A. (2015). Multivariate selection drives concordant patterns of pre- and postcopulatory sexual selection in a livebearing fish. *Nature Communications*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms9291>
- Drengsgaard, L., & Toft, S. (1999). *Sperm Competition in a Nuptial Feeding Spider , Pisaura mirabilis Author (s): Inger L . Drengsgaard and Søren Toft Published by : Brill Stable URL : https://www.jstor.org/stable/4535647 REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this articl.* 136(7), 877–897.
- Duran, N., Dunbar, S. G., Iii, R. A. E., & Standish, T. G. (2015). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology High frequency of multiple paternity in a solitary population of olive ridley sea turtles in Honduras. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.10.023>
- Eberhard, W. G. (1994). Evidence for Widespread Courtship During Copulation in 131 Species of Insects and Spiders, and Implications for Cryptic Female Choice. *Evolution*, 48(3), 711. <https://doi.org/10.2307/2410481>
- Eberhard, W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice.* (Princeton).
- Esquivel-Bobadilla, S., Adrian Lozano-Garza, O., García-De-León, F. J., Barriga-Sosa, I. de los A., & Jiménez, M. L. (2013). Development and characterization of 14 microsatellite loci in the beach wolf spider (*Arctosa littoralis*), using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 5(1), 261–263. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9782-7>
- Fedorka, K. M., & Mousseau, T. A. (2002). *Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry.* <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3052>
- Firman, R. C., Gasparini, C., Manier, M. K., & Pizzari, T. (2017). Postmating Female Control: 20 Years of Cryptic Female Choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(5), 368–382. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.02.010>
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection.* (London: Cl).
- Foelix, R. (1996). *Biology of Spiders.* (Vol. 330).
- Foelix, R. (2011). *Biology of spiders.*
- Fraser, C. I., Brahy, O., Mardulyn, P., Dohet, L., Mayer, F., & Grégoire, J. C. (2014). Flying the nest: Male dispersal and multiple paternity enables extrafamilial matings for the invasive bark beetle *Dendroctonus micans*. *Heredity*, 113(4), 327–333. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.34>

- Gaskett, A. C. (2007). Spider sex pheromones: Emission, reception, structures, and functions. *Biological Reviews*, 82(1), 27–48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2006.00002.x>
- Ghislandi, P. G., Albo, M. J., Tuni, C., & Bilde, T. (2014). *ghislandi2014.pdf*.
- Gray, E. M. (1997). Female red-winged blackbirds accrue material benefits from copulating with extra-pair males. *Animal Behaviour*, 53(3), 625–639. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0336>
- Gross. (1996). *Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes*.
- Gwynne, D. T. (2008). *Sexual Conflict over Nuptial Gifts in Insects*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093423>
- Hataway, R. A., Reed, D. H., & Noonan, B. P. (2011). Development of 10 microsatellite loci in the wolf spider *Arctosa sancterosae* (Araneae: Lycosidae). *Conservation Genetics Resources*, 3(2), 271–273. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9339-6>
- Helminen, P., Lokki, M. L., Ehnholm, C., Jeffreys, A., & Peltonen, L. (1988). Application of Dna “Fingerprints” To Paternity Determinations. *The Lancet*, 331(8585), 574–576. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91363-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91363-3)
- Hohoff, C., Franzen, K., Sachser, N., Ecology, S. B., & May, N. (2003). *Female Choice in a Promiscuous Wild Guinea Pig, the Yellow-Toothed Cavy (Galea musteloides)*. 53(6), 341–349.
- Honek, A. (1993). Intraspecific Variation in Body Size and Fecundity in Insects : A General Relationship. *Wiley on Behalf of Nordic Society Oikos*, 66(3), 483–492.
- Hotzy, C., & Arnqvist, G. (2009). Sperm Competition Favors Harmful Males in Seed Beetles. *Current Biology*, 19(5), 404–407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.045>
- House, C. M., & Simmons, L. W. (2003). Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus* : an example of sexually selected male genitalia. *Proceedings of the Royal Society B*, 270, 447–455. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2266>
- Huang, K., Mi, R., Dunn, D. W., Wang, T., & Li, B. (2018). Performing parentage analysis in the presence of inbreeding and null alleles. *Genetics*, 210(December), 1467–1481.
- Jakob, E. M., Marshall, S. D., & Uetz, G. W. (1996). Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*, 77, 61– 67.
- Jennions, M. D., & Petrie, M. (2000). *Why do females mate multiply ? A review of the genetic benefits*.
- Johnstone, R. A. (1995). Honest advertisement of multiple qualities using multiple signals. *Journal of Theoretical Biology*, 177(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80006-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80006-2)
- Jones, A. G., & Ardren, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12(10), 2511–2523. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01928.x>
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kaster, J. L., & Jakob, E. M. (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(2), 254–259. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.2.254>
- Krehenwinkel, H., Meese, S., Mayer, C., Ruch, J., Schneider, J. M., Bilde, T., ... Uhl, G. (2019). Cost effective microsatellite isolation and genotyping by high throughput sequencing. *The Journal of Arachnology*, 47(2), 190. <https://doi.org/10.1636/joa-s-16-017>
- Kvarnemo, C., Simmons, L. W., & Kvarnemo, C. (2013). *Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating*.
- Lewis, S. M., & South, A. (2012). *The Evolution of Animal Nuptial Gifts* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394288-3.00002-2>
- Lewis, S. M., Vahed, K., Koene, J. M., Engqvist, L., Perry, J. C., Gwynne, D. T., ... Engqvist, L. (2014). *Emerging issues in the evolution of animal nuptial gifts*. 3–5.
- Magris, M., Wignall, A. E., & Herberstein, M. E. (2015). The sterile male technique : irradiation negatively affects male fertility but not male courtship. *Journal of Insect Physiology*, 75, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.02.014>
- Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J., Ris, N., Prado, E., ... Kreiter, P. (2011). DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, 135(1–2), 142–155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01495.x>
- Marino, I. A. M., Riginella, E., Gristina, M., Rasotto, M. B., Zane, L., & Mazzoldi, C. (2015). Multiple paternity and hybridization in two smooth- hound sharks. *Nature Publishing Group*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep12919>
- McDonald, G. C., Spurgin, L. G., Fairfield, E. A., Richardson, D. S., & Pizzari, T. (2017). Pre- and postcopulatory sexual selection favor aggressive, young males in polyandrous groups of red junglefowl. *Evolution*, 71(6), 1653–1669. <https://doi.org/10.1111/evo.13242>
- Mello-Leitão, C. F. (1943). *Catálogo das aranhas do Rio Grande do Sul. Museu nacional*.
- Michalik, P., Reiher, W., Tinteln-Suhm, M., Coyle, F. A., & Alberti, G. (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(3), 284–309. <https://doi.org/10.1002/jmor.10309>

- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 883–893.
- Muck, C., Kempnaers, B., Kuhn, S., Valcu, M., & Goymann, W. (2009). *Paternity in the classical polyandrous black coucal (Centropus grillii)—a cuckoo accepting cuckoldry ?* (August). <https://doi.org/10.1093/beheco/arp118>
- Neumann, R., & Schneider, J. M. (2015). Differential investment and size-related mating strategies facilitate extreme size variation in contesting male spiders. *Animal Behaviour*, 101, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.12.027>
- Otronen, M., & Silva-Jothy, M. T. (1991). *The Effect of Postcopulatory Male Behaviour on Ejaculate Distribution within the Female Sperm Storage Organs of the Fly , Dryomyza anilis (Diptera : Dryomyzidae)* Author (s) : M . Otronen and M . T . Siva-Jothy Published by : Springer Stable URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0333-0_29. 29(1), 33–37.
- Pandulli-Alonso, I., Quaglia, A., & Albo, M. J. (2017). Females of a gift-giving spider do not trade sex for food gifts: A consequence of male deception? *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0953-8>
- Parker, G. A., Baker, R. R., & Smith, V. G. F. (1972). The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 36(3), 529–553. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(72\)90007-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(72)90007-0)
- Parker, G. A., & Birkhead, T. R. (2013). Polyandry: The history of a revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1613). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0335>
- Parmakelis, A., Balanika, K., Terzopoulou, S., Rigal, F., Beasley, R. R., Jones, K. L., ... Borges, P. A. V. (2013). Development of 28 polymorphic microsatellite markers for the endemic Azorean spider *Sancus acrensis* (Araneae, Tetragnathidae). *Conservation Genetics Resources*, 5(4), 1133–1134. <https://doi.org/10.1007/s12686-013-9976-7>
- Pavón-Peláez, C., Franco-Trecu, V., Pandulli-Alonso, I., Jones, T., & Albo, M. J. (n.d.). Alternative mating tactics or fixed strategies? A focus on worthless nuptial gift production by individual males. *Biol Lett*.
- Pélissié, B., Jarne, P., Sarda, V., & David, P. (2014). Disentangling precopulatory and postcopulatory sexual selection in polyandrous species. *Evolution*, 68(5), 1320–1331. <https://doi.org/10.1111/evo.12353>
- Peretti, A. V., & Eberhard, W. G. (2010). Cryptic female choice via sperm dumping favours male copulatory courtship in a spider. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(2), 271–281. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01900.x>
- Planas, E., Bernaus, L., & Ribera, C. (2014). *Development of novel microsatellite markers for the spider genus Loxosceles (Sicariidae) using next-generation sequencing* Author (s) : Enric Planas , Laia Bernaus and Carles Ribera Published by : American Arachnological. 42(3), 315–317.
- Prokop, P. (2007). *Insemination does not affect female mate choice in a nuptial feeding spider*. 0003. <https://doi.org/10.1080/11250000600727741>
- Prokop, P., & Maxwell, M. R. (2009). Female feeding regime and polyandry in the nuptially feeding nursery web spider, *Pisaura mirabilis*. *Naturwissenschaften*, 96(2), 259–265. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0477-6>
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). Population genetics software for exact test and ecumenism. *J. Hered.*, 86(GenePop (version 1.2).), 248–249.
- Rojas-Hernandez, N., Véliz, D., & Pardo, L. M. (2014). Use of novel microsatellite markers for population and paternity analysis in the commercially important crab *Metacarcinus edwardsii* (Brachyura: Cancridae). *Marine Biology Research*, 10(8), 839–844. <https://doi.org/10.1080/17451000.2013.863350>
- Rütten, K. B., Schulz, I., Olek, K., & Uhl, G. (2001). Polymorphic microsatellite markers in the spider *Pholcus phalangioides* isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology Notes*, 1(4), 255–257. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00092.x>
- Sanguinetti, C. J., Días Neto, E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 914–921.
- Schäfer, M. A., Misof, B., & Uhl, G. (2008). Effects of body size of both sexes and female mating history on male mating behaviour and paternity success in a spider. *Animal Behaviour*, 76, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.01.011>
- Schäfer, M. A., & Uhl, G. (2002). Determinants of paternity success in the spider *Pholcus phalangioides* (Pholcidae : Araneae) : the role of male and female mating behaviour. *Behav Ecol Sociobiol*, 368–377. <https://doi.org/10.1007/s00265-001-0448-9>
- Schneider, J. M., & Andrade, M. (2011). Spider Behaviour. In *Choice Reviews Online* (Vol. 48). <https://doi.org/10.5860/choice.48-1788>
- Schneider, J. M., & Lesmono, K. (2009). Courtship raises male fertilization success through post-mating sexual selection in a spider. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1670), 3105–3111. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0694>
- Simmons, L. W. (2001). *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. (Princeton).
- Simmons, L. W. (2005). *The Evolution of Polyandry : Sperm Competition , Sperm Selection , and Offspring Viability* Author (s) : Leigh W . Simmons Published by : Annual Reviews Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/30033799> REFERENCES Linked references are available on JSTOR. 36, 125–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.112501>
- Simmons, L. W., & Siva-Jothy, M. T. (1998). Sperm Competition in Insects: Mechanisms and the Potential. In *Sperm competition and sexual selection*. (p. 341).
- Siro, L. K., Brockmann, H. J., & Lapointe, S. L. (2007). Male postcopulatory reproductive success in the beetle, *Diaprepes abbreviatus*.

- Animal Behaviour*, 74(1), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.12.004>
- Stalhandske, P. (2001). *Nuptial gift in the spider Pisaura mirabilis maintained by sexual selection*. 12(6), 691–697.
- Stalhandske, P. (2002). *Nuptial gifts of male spiders function as sensory*. (March 2001), 905–908. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1917>
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*, 264. (Oxford: Ox).
- Suhm, M., & Alberti, G. (1993). The fine structure of the spermatheca of Amaurobius fenestralis (Stroem, 1768)(Amaurobiidae, Araneae). *Bullettino Delle Sedute Della Accademia Gioenia Di Scienze Naturali*.
- Suhm, M., & Alberti, G. (1996). The fine structure of the spermatheca of Pardosa lugubris (Walckenaer, 1802). *Revue Suisse de Zoologie*, Volume hor(January 1996), 635–642.
- Taborsky, M., Oliveira, R. F., & Brockmann, H. J. (2008). Alternative reproductive tactics and the evolution of alternative allocation phenotypes. *Alternative Reproductive Tactics: An Integrative Approach*, 25–51. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542602.003>
- Taylor, M. L., Price, T. A. R., & Wedell, N. (2014). Polyandry in nature: a global analysis. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(7), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.005>
- Tieppo Da Silveira, L. C., & 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(2), 539–541. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02338.x>
- Toft, S., & Albo, M. J. (2015). Optimal numbers of matings: The conditional balance between benefits and costs of mating for females of a nuptial gift-giving spider. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(2), 457–467. <https://doi.org/10.1111/jeb.12581>
- Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In “*Sexual Selection and the Descent of Man, 1871- 1971*” (B. Campbel, pp. 136–179). Chicago.
- Tuni, C., Goodacre, S., Bechsgaard, J., & Bilde, T. (2012). Moderate multiple parentage and low genetic variation reduces the potential for genetic incompatibility avoidance despite high risk of Inbreeding. *PLoS ONE*, 7, 29636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029636>
- Tyler, F., Harrison, X. A., Bretman, A., Veen, T., Rodríguez-Muñoz, R., & Tregenza, T. (2013). Multiple post-mating barriers to hybridization in field crickets. *Molecular Ecology*, 22(6), 1640–1649. <https://doi.org/10.1111/mec.12187>
- Uhl, G. (1994). Genital Morphology and Sperm Storage in. *Acta Zoologica*, 75(1), 1–12.
- Uhl, G. (2000). Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). *Proceedings of the 19th European Colloquium of Arachnology, Aarhus, Den(July 2000)*, 145–156.
- Uhl, G., Zimmer, S. M., Renner, D., & Schneider, J. M. (2015). Exploiting a moment of weakness: male spiders escape sexual cannibalism by copulating with moulting females. *Scientific Reports*, 5, 16928. <https://doi.org/10.1038/srep16928>
- Vahed, K. (1998). The function of nuptial feeding in insects: A review of empirical studies. In *Biological Reviews* (Vol. 73). <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00025.x>
- Vahed, K. (2007). *All that Glitters is not Gold : Sensory Bias , Sexual Conflict and Nuptial Feeding in Insects and Spiders*. 105–127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01312.x>
- Vahed, K., Road, K., & Gb, D. E. (1998). *The function of nuptial feeding in insects : a review of empirical studies*.
- van Lieshout, E., & Elgar, M. A. (2011). Longer exaggerated male genitalia confer defensive sperm-competitive benefits in an earwig. *Evolutionary Ecology*, 25(2), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s10682-010-9422-1>
- Van Oosten, A. R., Matthysen, E., & Heylen, D. J. A. (2016). Mating strategies and multiple paternity, assessed by microsatellites, of the dispersal-limited, ectoparasitic tree-hole tick, Ixodes arboricola. *International Journal for Parasitology*, 46(9), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.004>
- Webster, M. S., & Reichart, L. (2005). Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Methods in Enzymology*, 395, 222–238. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95014-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95014-3)
- West, H. P., & Toft, S. (1999). Last-Male Sperm Priority and the Mating System of the Haplogyne Spider Tetragnatha extensa (Araneae: Tetragnathidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103(3), 239–248. <https://doi.org/10.1023/A>
- Wooninck, L. M., Warner, R. R., & Fleischer, R. C. (2000). Relative fitness components measured with competitive PCR. *Molecular Ecology*, 9, 1409–1414.
- Yue, G. H., Li, J. Le, Wang, C. M., Xia, J. H., Wang, G. L., & Feng, J. B. (2010). High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, Procambarus clarkii. *International Journal of Biological Sciences*, 6(1), 107–115. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.107>
- Zahavi, A. (1975). *Mate Selection-A Selection for a Handicap*. 205–214.

Material Suplementario

Tabla 1S: Diferencias entre grupos experimentales (**N-S** y **S-N**) en *Paratrechalea ornata* en rasgos del macho (tamaño en milímetros y edad desde la muda en días) y sus parámetros de comportamiento copulatorio (duración de cópula en minutos y número de inserciones por cópula); y rasgos de la hembra (tamaño en milímetros y edad desde la muda en días) y sus parámetros de comportamiento reproductivo (tiempo transcurrido en días hasta la construcción del saco de huevos -latencia oviposición-, tiempo transcurrido en días hasta la eclosión de las crías -latencia de emergencia-, y número de crías por hembra).

		primer macho			segundo macho		
		mediana	SD	tam. muestral	mediana	SD	tam. muestral
Rasgos generales	tamaño N (mm)	4.25	0.25	10	4.30	0.32	13
	tamaño S (mm)	4.30	0.34	13	4.30	0.35	12
Comp. copulatorio	Dur cópula N (min)	1.25	0.92	18	1.20	1.09	21
	Dur cópula S (min)	1.10	0.97	21	0.95	0.89	18
	Nro. Ins N	3	1.47	18	2	1.27	21
	Nro. Ins S	2	1.40	21	2.50	1.48	18
		hembra N-S			hembra S-N		
		mediana	SD	tam. muestral	mediana	SD	tam. muestral
Rasgos generales	tamaño (mm)	4.60	0.28	9	4.40	0.29	7
Comp. reproductivo	Lat Oviposición (días)	17	1.94	5	17	2.45	5
	Lat emergencia (días)	41	2.60	5	41	1.41	5
	Nro. Crías	52.50	27.6	9	70	16.6	5

Characterization of four hypervariable microsatellite loci in a nuptial gift-giving spider and its prospect for paternity analyses

Authors: Pandulli-Alonso, Irene, Germil, Mariana, Albo, María J., and Tomasco, Ivanna H.

Source: Arachnology, 18(5) : 477-481

Published By: British Arachnological Society

URL: <https://doi.org/10.13156/arac.2020.18.5.477>

BioOne Complete (complete.BioOne.org) is a full-text database of 200 subscribed and open-access titles in the biological, ecological, and environmental sciences published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Complete website, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/terms-of-use.

Usage of BioOne Complete content is strictly limited to personal, educational, and non - commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

BioOne sees sustainable scholarly publishing as an inherently collaborative enterprise connecting authors, nonprofit publishers, academic institutions, research libraries, and research funders in the common goal of maximizing access to critical research.

Characterization of four hypervariable microsatellite loci in a nuptial gift-giving spider and its prospect for paternity analyses

Irene Pandulli-Alonso¹

Mariana Germil^{1,2}

María J. Albo¹

Ivanna H. Tomasco²

¹Departamento de Ecología y Biología Evolutiva,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Avenida Italia 3318,
Montevideo, Uruguay

²Departamento de Ecología y Evolución,
Facultad de Ciencias,
Universidad de la República,
Iguá 4225,
Montevideo, Uruguay
email: ivanna@fcien.edu.uy

Abstract

In the gift-giving spider *Paratrechalea ornata*, females mate multiple times and apparently may bias the paternity according to the nuptial gift content (nutritive or worthless). Paternity studies using microsatellite markers would, therefore, be ideal for studying male fertilization success for female offspring. We genotyped four microsatellites previously reported in one species of the genus using 43 individuals from four different localities in Uruguay. We describe the allelic and genotypic variation in all loci, and compare the findings to the reported variation for the genus. Except for one locus, all loci showed significant departure from the Hardy-Weinberg equilibrium due to heterozygote deficit. This could possibly be explained by the mixed nature of the sample and the effect of the population structure. These loci, and especially those that are highly hypervariable, are an important tool for paternity assessment and would allow a better understanding of the role of post-copulatory processes in *P. ornata*.

Keywords: Araneae • molecular markers • Neotropical spider • *Paratrechalea ornata* • STR • Uruguay

Introduction

In mating systems where females are polyandrous and have internal fertilization, male paternity success depends not only on access to matings but also on the success to fertilize female eggs. This is because pre-copulatory (courtship and mating traits) and post-copulatory (sperm competition traits) processes ultimately interact, determining the fitness of individuals (Pélissié *et al.* 2014; Devigili *et al.* 2015; McDonald *et al.* 2017).

A fundamental issue to understand the effect of these processes on individual reproductive success is to know the paternity shared by males. Traditionally in invertebrates, paternity studies have been developed using the sterile male technique (House & Simmons 2003; Bjork & Pitnick 2006; Sirot, Brockmann & Lapointe 2007; Hotzy & Arnqvist 2009; van Lieshout & Elgar 2011). This technique involves the exposure of males to X-rays, resulting in sterile males with competitive ability of their sperm to fertilize female eggs, but producing undeveloped eggs. In spite of the sim-

plicity and low cost, this technique is limited in several ways (e.g. a very few number of fathers can be identified) and molecular markers such as microsatellites are preferred instead (Helminen *et al.* 1988). Microsatellites, also known as short tandem repeats (STRs), are hypervariable molecular markers of repetitive DNA (length range 2–10 bp) that may show high levels of intraspecific polymorphism. Multiple microsatellites have been characterized and used for paternity assessment in diverse invertebrates species (Yue *et al.* 2010; Fraser *et al.* 2014; Rojas-Hernandez, Véliz & Pardo 2014; Van Oosten, Matthysen & Heylen 2016).

Compared to many other taxa, the use of microsatellites for paternity analyses has scarcely been applied in spiders (Schäfer, Misof & Uhl 2008; Tuní *et al.* 2012; Brewer *et al.* 2014; Uhl *et al.* 2015; Krehenwinkel *et al.* 2019), most probably because the sterile male technique has been used successfully in this group (Austad 1982; Christenson & Cohn 1988; Kaster & Jakob 1997; Drengsgaard & Toft 1999; West & Toft 1999; Danielson-François *et al.* 2012; Neumann & Schneider 2015) and even recently validated (Magris Wignall & Herberstein 2015). The species *Paratrechalea galianoae* (Carico, 2005) is one of the few Neotropical spiders for which 12 microsatellites have been isolated and reported (Tieppo Da Silveira & Bonatto 2009). In 27 individuals of this species, those loci showed high polymorphism, and between three and 14 alleles were identified. Although little is known about this particular species, the genus is documented to have males offering nuptial gifts to females as a reproductive strategy (Costa-Schmidt, Carico & de Araújo 2008; Albo & Costa 2010).

The presence of nuptial gifts is typical in the semi-aquatic species *Paratrechalea ornata* (Mello-Leitão, 1943), which is a model species for studying sexual selection in relation to this particular reproductive strategy (Albo *et al.* 2014). Males can offer either nutritive (prey) or worthless gifts (prey leftovers or small plant parts) wrapped in silk (Albo *et al.* 2014). Females are polyandrous (Pandulli-Alonso, Quaglia & Albo 2017) and it has been suggested that they may bias sperm storage and paternity toward males offering nutritive gifts (Albo & Peretti 2015). The comprehension of the complex post-copulatory processes and paternity patterns in this species requires, therefore, the development of new techniques. The goal of this study was to test cross-species amplification and to evaluate the viability of PCR amplification and allele variability of the microsatellite loci in *P. ornata*, using those already reported for one species of the genus (Tieppo Da Silveira & Bonatto 2009).

Material and methods

We selected randomly 43 adult individuals of *Paratrechalea ornata* collected and preserved in ethanol 75% by MJA and collaborators during 2012–2016. We worked using individuals from four localities (Fig. 1): 10 from Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres, 32°56'58.261"S 54°27'21.808"E, 10 from Lunarejo, Rivera, 31°13'50.653"S

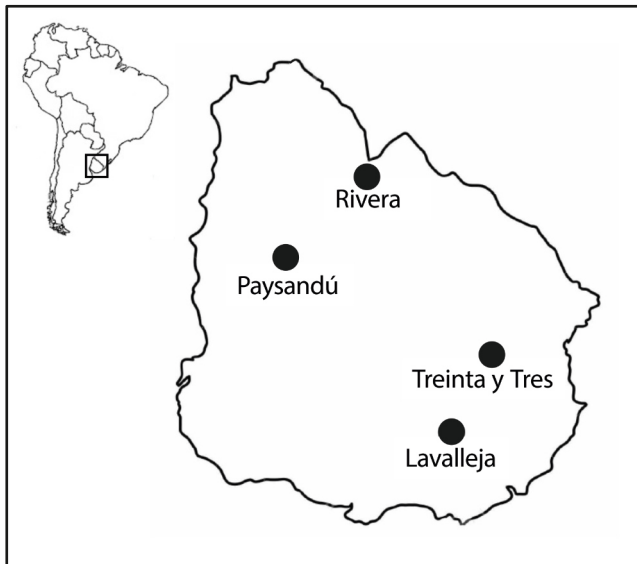


Fig. 1: Schematic representation of Uruguay indicating the four studied populations of *P. ornata*: Lunarejo, Rivera; Queguay, Paysandú; Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres; Paso del Molino, Lavalleja.

55°52'17.835"E), 10 from Queguay, Paysandú, 32°8'8.344"S 57°56'32.168"E, and 13 from Paso del Molino, Lavalleja, 34°16'39.256"S 55°14'0.729"E.

We extracted DNA from the spiders' legs following the modified protocol from Miller *et al.* (1988) and quantified DNA concentrations from extractions using nanodrop (NANODROP LITE Spectrophotometer, Thermo Scientific). We carried out the amplification by PCR in a total volume of 10 µl containing: 0.1 µl Taq Polymerase (5 units µl⁻¹), 1 µl Buffer, 0.8 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl of each primer (10 Mm), 0.2 µl dNTPs including 10 mM of each dNTP, 2.5 µl RNA and DNA-free water and 5 µl DNA dilution (4 µg µl⁻¹). The amplification conditions were: 95°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s of denaturalization, 56°C for 30 s of annealing and 72°C for 30 s of extension, and a final extension at 72°C for 5 min. In each reaction, the corresponding negative control was included replacing the volume of the DNA sample by the same volume of DNA free water. In the cases where the amplification failed, we tested other reactions under the following conditions: 1) diminishing the association temperature up to 47°C, 2) increasing concentration of both primers, 3) increasing concentration of Taq Polymerase, and 4) increasing MgCl₂ concentration up to 3.5 mM in final volume. We analysed the 12 loci reported by Tieppo-Silveira and Bonatto (2009) for *P. galianoae*: A1, A6, B2, B3, B4, C1, D2, D4, F1, F2, G1, and H2. In all cases, the forward primer of each pair was fluorescently labelled with FAM or HEX. The PCR products were analysed by electrophoresis in polyacrylamide gels during 20 min at 170V, and visualized in silver staining using the modified protocol of Sanguinetti, Días Neto & Simpson (1994). The size of PCR products was estimated by contrasting the weight with a 100bp DNA size standard (RAINBOW Bioron). Successful amplifications were analysed by electrophoresis on an ABI 3130 Genetic Analyser housed in the Unidad de Biología Molecular of the

Institut Pasteur (Montevideo, Uruguay). A LIZ600 size standard was included in all lanes. The fragment sizes were determined and genotypes were assigned using the Peak Scanner Software v1 software (Applied Biosystems).

The program GenePop (Raymond and Rousset, 1995) was used to: 1) estimate observed and expected allele and genotypic frequencies, 2) test for departures of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium between pair of loci using the Exact Test based on 10,000 Markov chain iterations, 3) assess the presence of null alleles by Maximum likelihood, and 4) test for allele and genotypic frequency differentiation among populations. The program Cervus 3.0 (Kalinowski, Taper & Marshall 2007) was used to estimate the Polymorphic Information Content (PIC), paternity non-exclusion probability (first and second parent, NE-1P and NE-2P, respectively) and the combined non-exclusion probability of identity (NE-I) for each marker in the overall values for the microsatellites set in all population pooled.

Additionally, we performed a preliminary assessment and evaluated the markers by genotyping a female and 25 spiderlings from her egg sac (approximately ¼ of total number of spiderlings). The female carrying an eggsac was previously collected from the field in the Minas population and raised until spiderlings emerged from the egg sac. Both the female and the spiderlings were preserved in 95% ethanol. We followed the same protocol mentioned above to obtain the genotypes.

Results

We successfully genotyped four loci: B2, B3, C1, and D4. The remaining eight loci either did not amplify, amplified partially, or did it in a non-reproducible way for *P. ornata*, so they were discarded for the analyses.

A summary of the information is found in Table 1, which shows the absolute size and frequencies of the alleles present in the sample, and indices such as PIC, NE-1P, NE-2P, and NE-I by locus. We found high allele variation in the four loci, including 3, 8, 8, and 13 alleles in C1, B3, B2, and D4, respectively, while the allele frequencies ranged from 1% to 46%. The four genotyped loci presented very different values for heterozygosity, which was found in the range of 0.32 to 0.80, as well as for other indices such as the PIC that presented the range of 0.53 to 0.86. According to the characteristics of these two indices, those loci with more alleles and with more evenly distributed allele frequencies presented the highest values. This is well observed by comparing, for instance, the PIC values between the B2 and B3 loci. Both markers have the same number of alleles, but the PIC is much higher in B3 (PIC = 0.80) than in B2 (PIC = 0.53), as this last is having two high frequency alleles (ie: 0.45 and 0.37) and the remaining at low frequency.

All loci except B2 showed a significantly lower observed heterozygosity than the expected by HWE when considering the entire sample with all populations ($p < 0.001$). However, we did not find HWE departures for most loci in

Locus	Size	Freq.	Summary statistics								
			N	Na	Ho	He	HWE	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-I
C1	186	0.26	43	3	0.35	0.61	***	0.53	0.82	0.67	0.23
	188	0.53									
	190	0.19									
B3	322	0.01	36	8	0.69	0.83	***	0.80	0.53	0.35	0.06
	324	0.20									
	326	0.12									
	328	0.11									
	330	0.05									
	332	0.19									
	342	0.04									
	346	0.25									
B2	98	0.05	40	8	0.73	0.66	***	0.59	0.76	0.61	0.19
	102	0.01									
	106	0.01									
	110	0.03									
	112	0.45									
	114	0.37									
	116	0.06									
D4	122	0.01	31	13	0.65	0.89	***	0.86	0.41	0.25	0.03
	206	0.18									
	210	0.10									
	212	0.19									
	214	0.06									
	216	0.05									
	218	0.11									
	220	0.08									
	222	0.02									
	224	0.02									
	226	0.15									
	228	0.02									
	230	0.02									
	250	0.02									
combined loci								0.70	0.13	0.04	0.00

Table 1: Genotyped and evaluated microsatellites (four loci) in *P. ornata*. Absolute sizes (Size) and frequencies (Freq.) of alleles. N = number of individuals used, Na = number of alleles per loci, Ho = observed heterozygosity, He = expected by Hardy-Weinberg equilibrium, HWE = probability for testing Hardy-Weinberg equilibrium (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

individual populations. Additionally, we did not find a significant frequency of null alleles (different from zero) in all loci. The exact test for genic and genotypic differentiation among populations was highly significant ($p < 0.01$).

The analysis of the genotypes of the female and her pooled spiderlings confirmed the presence of maternal alleles in the last one and the absence of greater variation contribution by the father(s), i.e. spiderling genotype: B2: 112/114, C1: 188/188, D4: 212/214, B3: 328/328.

Discussion

From the 12 polymorphic microsatellites (3–13 alleles per locus) reported for one species of *Paratrechalea* (Tieppo Da Silveira & Bonatto 2009) and evaluated here, we successfully amplified and genotyped four loci (B2, B3, C1 and D4). This result probably reflects the presence of nucleotide substitutions in the flanking sequences of the remaining 8 loci in the species *P. ornata* hindering the primers association during the PCR. For C1 and B3 loci we

found similar allelic variation than the one described in *P. galianoae* (Tieppo Da Silveira and Bonatto, 2009), but for B2 and D4 we found higher number of alleles indicating the importance of markers evaluation before its use in other species. The difference may be because we have a much larger (43 individuals) and diverse (four localities) sample size compared to the study done in *P. galianoae* (24 individuals from a single locality). We contest that these differences result from intrinsic causes of the species, such as a major population size in *P. ornata*, because the average heterozygosity from both species is similar in all loci. In any case, it is known that the cross-species transferability of microsatellite markers is unevenly distributed across taxa (Barbará *et al.* 2007); thus, we need to evaluate its viability on a case-by-case basis.

The results revealed that the four loci were far apart from HWE, particularly showing a reduction in heterozygosity in three of them and, according to the data, this is not due to the presence of null alleles. Because our sample is composed by four geographical distant sub-populations, a suitable explanation could be the well-known Wahlund effect

(Wahlund 1928). This implies a reduction of heterozygosity in a population caused by sub-population structure. Namely, if sub-populations have different allele frequencies then the overall heterozygosity is reduced, even if the sub-populations themselves are in HWE. In line with this interpretation, we found that, in most cases, the loci did not depart from HWE within each population, and a significant differentiation among populations was found both in gene and genotypic frequencies.

It is known that the use of microsatellite markers presents limitations, e.g. the absence of HWE and the presence of null alleles for some loci make these markers difficult for certain applications, like traditional paternity assessment (reviewed by Jones & Ardren 2003). However, it is a modern and valuable genetic tool to apply for paternity assessment (Webster & Reichart 2005; Taylor, Price & Wedell 2014) and possible solutions to the limitations have been reported (Huang *et al.* 2018). In our particular case, the high variation found in these markers makes them ideal for paternity studies among known males, for instance, by using the competitive microsatellite PCR technique (Wooninck, Warner & Fleischer 2000; Bussiere *et al.* 2010). This technique can determine the contribution of males in a sperm sample, as well as account for the paternity proportions of a full clutch. It is a prevalent tool for paternity assessment and requires the evaluation of exclusive allele markers in each father (i.e. not shared by other males or the female) among the offspring, without assuming HWE. It has been successfully applied in insects (Bretman *et al.* 2009; Tyler *et al.* 2013) and it is ideal for estimating paternity distributions of large numbers of offspring simultaneously. Our preliminary analyses show low variation in the spiderlings, suggesting some non-exclusive alternative hypotheses: 1) the female mated with one or very few males, 2) mated males were female-like genotype, which is very likely in the case of most frequent alleles, and 3) if female mated with many males, then she may have selected post-copulatory the offspring of one or very few males. In any case, our results indicate the feasibility of the technique, as well as show that the loci D4 followed by B2 will be the best to use due to its greatest variation and fundamentally due to its PIC value. The preliminary analyses of the female and spiderlings also suggest that it will take further experimental effort in order to access males presenting exclusive alleles.

To sum up, we optimized four microsatellites for the gift-giving spider *P. ornata*. These markers could be used for purposes, such as assessing relatedness among spiders, or understanding geographic structures between closely related populations (reviewed in Brewer *et al.* 2014). Any of these analyses would be favoured by the new massive sequencing techniques, to identify more useful loci (e.g. Parmakelis *et al.* 2013; Planas, Bernaus & Ribera 2014; Krehenwinkel *et al.* 2019). Some of the markers are highly variable and represent a potential molecular tool for paternity analyses opening avenues to better understand the role of the post-copulatory processes in this species. In this sense, these microsatellites would be especially important to

deeply comprehend whether females can bias paternity toward certain males according to the nuptial gift content.

Acknowledgements

We thank Magali Ferreira and Nicolás Téliz for helping during field trips and lab work. I. Pandulli-Alonso was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica de la UdelAR (PAIE-CSIC), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Animal Behaviour Society (ABS), and American Arachnological Society (AAS). This work was supported by the Caldeyro-Barcia National Science Award (to MJA), PEDECIBA, Uruguay. M. J. Albo was supported by a postdoctoral fellowship (IIBCE, Uruguay). M. J. Albo and I. Tomasco were supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (SNI-ANII).

References

- 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.
- ALBO, M. J., MELO-GONZÁLEZ, V., CARBALLO, M., BALDENE-GRO, F., TRILLO, M. C. & COSTA, F. G. 2014: Evolution of worthless gifts is favoured by male condition and prey access in spiders. *Animal Behaviour* **92**: 25–31.
- ALBO, M. J. & PERETTI, A. V. 2015: Worthless and nutritive nuptial gifts: mating duration, sperm stored and potential female decisions in spiders. *PLoS One* **10**: 129453.
- AUSTAD, S. N. 1982: First male sperm priority in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela* (Walckenaer). *Evolution* **36**: 777–785.
- BARBARÁ, T., PALMA-SILVA, C., PAGGI, G. M., BERED, F., FAY, M. F. & LEXER, C. 2007: Cross species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759–3767.
- BJORK, A. & PITNICK, S. 2006: Intensity of sexual selection along the anisogamy–isogamy continuum. *Nature* **441**: 742–745.
- BRETMAN, A., NEWCOMBE, D. & TREGENZA, T. 2009: Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. *Molecular Ecology* **18**: 3340–3345.
- BREWER, M. S., COTORAS, D. M., CROUCHER, P. J. P. & GILLESPIE, R. G. 2014: New sequencing technologies, the development of genomics tools, and their applications in evolutionary arachnology. *Journal of Arachnology* **42**: 1–15.
- BUSSIERE, L. F., DEMONT, M., PEMBERTON, A. J., HALL, M. D. & WARD, P. I. 2010: The assessment of insemination success in yellow dung flies using competitive PCR. *Molecular Ecology Resources* **10**: 292–303.
- CHRISTENSON, T. E. & COHN, J. 1988: Male advantage for egg fertilization in the golden orb-weaving spider (*Nephila clavipes*). *Journal of Comparative Psychology* **102**: 312–318.
- 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.
- DANIELSON-FRANÇOIS, A., HOU, C., COLE, N. & TSO, I. 2012: Scramble competition for moulting females as a driving force for extreme male dwarfism in spiders. *Animal Behaviour* **84**: 937–945.
- DEVIGILL, A., EVANS, J. P., DI NISIO, A. & PILASTRO, A. 2015: Multivariate selection drives concordant patterns of pre- and postcopulatory sexual selection in a livebearing fish. *Nature Communications* **6**: 8291.
- DRENGSGAARD, I. L. & TOFT, S. 1999: Sperm competition in a nuptial feeding spider, *Pisaura mirabilis*. *Behaviour* **136**: 877–897.
- FRASER, C. I., BRAHY, O., MARDULYN, P., DOHET, L., MAYER, F. & GRE, J. 2014: Flying the nest: male dispersal and multiple paternity enables extrafamilial matings for the invasive bark beetle *Dendroctonus micans*. *Heredity* **113**: 327–333.

- HELMINEN, P., EHNHOLM, C., LOKKI, M. L., JEFFREYS, A. & PELTONEN, L. 1988: Application of DNA "fingerprints" to paternity determinations. *Lancet* **1**: 574–576.
- HOTZY, C. & ARNQVIST, G. 2009: Report sperm competition favors harmful males in seed beetles. *Current Biology* **19**: 404–407.
- HOUSE, C. M. & SIMMONS, L. W. 2003: Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 447–455.
- HUANG, K., MI, R., DUNN, D. W., WANG, T. & LI, B. 2018: Performing parentage analysis in the presence of inbreeding and null alleles. *Genetics* **210**: 1467–1481.
- JONES, A. G. & ARDREN, W. R. 2003: Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**: 2511–2523.
- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L. & MARSHALL, T. C. 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099–1106.
- KASTER, J. L. & JAKOB, E. M. 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.
- KREHENWINKEL, H., MEESE, S., MAYER, C., RUCH, J., SCHNEIDER, J., BILDE, T., KÜNZEL, S., HENDERSON, J. B., RUS-SACK, J., SIMISON, W. B., GILLESPIE, R. & UHL, G. 2019: Cost effective microsatellite isolation and genotyping by high throughput sequencing. *Journal of Arachnology* **47**: 190–201.
- MAGRIS, M., WIGNALL, A. E. & HERBERSTEIN, M. E. 2015: The sterile male technique: irradiation negatively affects male fertility but not male courtship. *Journal of Insect Physiology* **75**: 85–90.
- MCDONALD, G. C., SPURGIN, L. G., FAIRFIELD, E. A., RICHARDSON, D. S. & PIZZARI, T. 2017: Pre- and postcopulatory sexual selection favor aggressive, young males in polyandrous groups of red junglefowl. *Evolution* **71**: 1653–1669.
- MILLER, S., DIKES, D. & POLESKY, H. 1988: A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**: 215.
- NEUMANN, R. & SCHNEIDER, J. M. 2015: Differential investment and size-related mating strategies facilitate extreme size variation in contesting male spiders. *Animal Behaviour* **101**: 107–115.
- PANDULLI-ALONSO, I., QUAGLIA, A. & ALBO, M. J. 2017: Females of a gift-giving spider do not trade sex for gifts: a consequence of male deception? *BMC Evolutionary Biology* **17**: 1–8.
- PARMAKELIS, A., BALANIKA, K., TERZOPOULOU, RIGAL, S. F., BEASLEY, R. R., JONES, K. L., LANCE, S. L., WHITTAKER, R. J., TRIANTIS, K. A. & BORGES, P. A. V. 2013: Development of 28 polymorphic microsatellite markers for the endemic Azorean spider *Sancus acorensis* (Araneae, Tetragnathidae). *Conservation Genetics Resources* **5**: 1133–1134.
- PÉLISSIE, B., JARNE, P., SARDA, V. & DAVID, P. 2014: Disentangling precopulatory and postcopulatory sexual selection in polyandrous species. *Evolution* **68**: 1320–1331.
- PLANAS, E., BERNAUS, L. & RIBERA, C. 2014: Development of novel microsatellite markers for the spider genus *Loxosceles* (Sicariidae) using next-generation sequencing. *Journal of Arachnology* **42**: 315–317.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 1995: Population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity* **86**: 48–249.
- ROJAS-HERNANDEZ, N., VÉLIZ, D. & PARDO, L. M. 2014: Use of novel microsatellite markers for population and paternity analysis in the commercially important crab *Metacarcinus edwardsii* (Brachyura: Cancridae). *Marine Biology Research* **8**: 839–844.
- SANGUINETTI, C. J., DÍAS NETO, E. & SIMPSON, A. J. 1994: Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**: 914–921.
- SCHÄFER, M. A., MISOF, B. & UHL, G. 2008: Effects of body size of both sexes and female mating history on male mating behaviour and paternity success in a spider. *Animal Behaviour* **76**: 75–86.
- SIROT, L. K., BROCKMANN, H. J. & LAPOINTE, S. L. 2007: Male postcopulatory reproductive success in the beetle, *Diaprepes abbreviatus*. *Animal Behaviour* **74**: 143–152.
- TAYLOR, M. L., PRICE, T. A. R. & WEDELL, N. 2014: Polyandry in nature: a global analysis. *Trends in Ecology & Evolution* **29**: 376–383.
- TIEPPO DA SILVEIRA, L. C. & 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.
- TUNI, C., GOODACRE, S., BECHSGAARD, J. & BILDE, T. 2012: Moderate multiple parentage and low genetic variation reduces the potential for genetic incompatibility avoidance despite high risk of inbreeding. *PLoS One* **7**: 29636.
- TYLER, F., HARRISON, X. A., BRETMAN, A., VEEN, T., RODRÍGUEZ-MUÑOZ, R. & TREGENZA, T. 2013: Multiple post-mating barriers to hybridization in field crickets. *Molecular Ecology* **22**: 1640–1649.
- UHL, G., ZIMMER, S. M., RENNER, D. & SCHNEIDER, J. M. 2015: Exploiting a moment of weakness: male spiders escape sexual cannibalism by copulating with moulting females. *Science Reports* **5**: 16928.
- VAN LIESHOUT, E. & ELGAR, M. A. 2011: Longer exaggerated male genitalia confer defensive sperm-competitive benefits in an earwig. *Evolutionary Ecology* **25**: 351–362.
- VAN OOSTEN, A. R., MATTHYSEN, E. & HEYLEN, D. J. A. 2016: Mating strategies and multiple paternity, assessed by microsatellites, of the dispersal-limited, ectoparasitic tree-hole tick *Ixodes arboricola*. *International Journal of Parasitology* **46**: 593–602.
- WAHLUND, S. 1928: Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **11**: 65–106.
- WEBSTER, M. S. & REICHART, L. 2005: Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Methods in Enzymology* **395**: 222–238.
- WEST, H. P. & TOFT, S. 1999: Last-male sperm priority and the mating system of the haplogyne spider *Tetragnatha extensa* (Araneae: Tetragnathidae). *Journal of Insect Behavior* **12**: 433–450.
- WOONINCK, L. M., WARNER, R. R. & FLEISCHER, R. C. 2000: Relative fitness components measured with competitive PCR. *Molecular Ecology* **9**: 1409–1414.
- YUE, G. H., LI, J. L., WANG, C. M., XIA, J. H., WANG, G. L. & FENG, J. B. 2010: High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *International Journal of Biological Sciences* **6**: 107–115.