

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE POSTGRADO
DOCTOR EN CIENCIAS, ÁREA BIOLOGÍA

**ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS Y SISTEMA DE
APAREAMIENTO DEL CANGREJO ESTUARIAL *NEOHELICE*
(*CHASMAGNATHUS*) *GRANULATA* (BRACHYURA:
GRAPSOIDEA: VARUNIDAE)**

Tesista: Lic. María Paz Sal Moyano
Director: Dra. María Andrea Gavio
Co-director: Dr. Tomás Luppi

Laboratorio de Humedales y Ambientes Costeros
Estación Costera J. J. Nágera,
Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (CONICET, UNMdP)
2012



ÍNDICE

Resúmenes	1
Capítulo I: Introducción General	4
Capítulo II: Sistema de apareamiento de <i>Neohelice granulata</i> : efecto de la arquitectura de la cueva	
Introducción	16
Materiales y Métodos	21
Resultados	25
Discusión	34
Capítulo III: Receptividad de hembras de <i>Neohelice granulata</i> : diferentes estrategias que maximizan su éxito reproductivo	
Introducción	41
Materiales y Métodos	46
Resultados	50
Discusión	61
Capítulo IV: Señales involucradas en la elección de la pareja en <i>Neohelice granulata</i>	
Introducción	67
Materiales y Métodos	71
Resultados	76
Discusión	81
Capítulo V: Comportamiento y estrategias reproductivas de <i>Neohelice granulata</i> : factores que afectan la cópula y el cuidado de pre y post-cópula	
Introducción	88
Materiales y Métodos	94
Resultados	102
Discusión	113
Capítulo VI: Discusión General	124
Bibliografía	132
Agradecimientos	x

Resúmenes

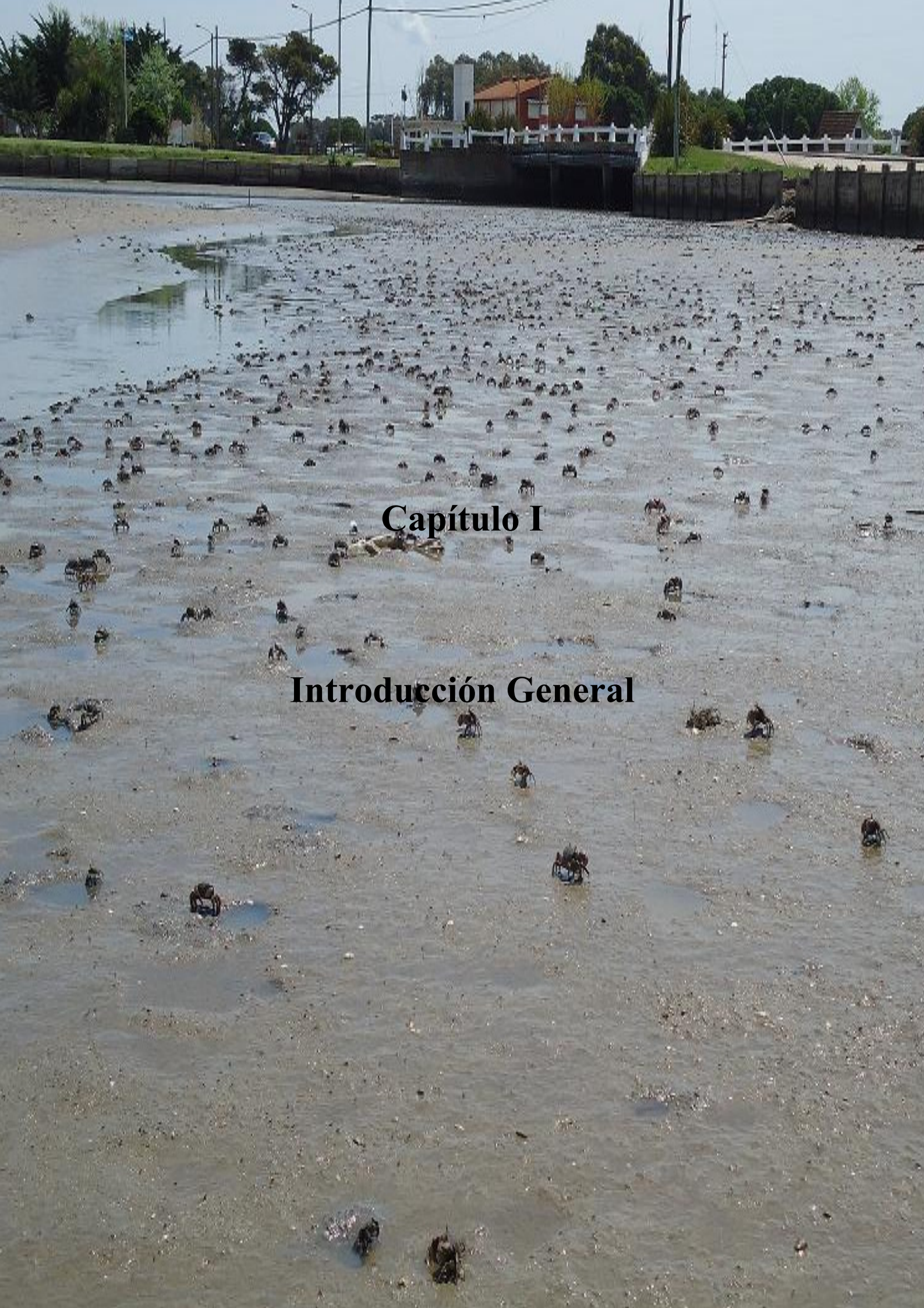


Resumen

El sistema de apareamiento refleja el patrón de monopolización de la pareja en espacio y tiempo. Consiste en el desarrollo de estrategias sexo-específicas involucradas en aumentar el *fitness* de la descendencia y dependen del tipo de ambiente. En esta tesis, se encontró que el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata* está basado en la defensa del recurso cuevas; siendo los machos grandes los que construyen una cueva con cámara, cerrada en Laguna Mar Chiquita (LMC) y abierta en San Antonio Oeste (SAO), en la cual pudo ocurrir la cópula. Los machos de menores tallas mostraron diversas estrategias reproductivas que les permitieron aparearse: cópula en superficie o ubicarse en cuevas vacías de machos grandes. En relación a las hembras receptivas, se encontraron dos tipos, con receptividad corta y extendida. Las primeras presentaron receptáculos seminales (RS) llenos y desovaron, mientras que las segundas presentaron RS vacíos y no desovaron. Esta capacidad que les permitió controlar el momento del desove se atribuyó a diversas estrategias reproductivas que consistieron en la presencia de [1] un opérculo de la vulva que se vuelve móvil en las hembras receptivas mediante un mecanismo de descalcificación, [2] secreciones del RS que permitirían mantener el esperma acumulado viable, y [3] un tejido amorfo en la unión del oviducto y el RS que regularía el momento del desove. La selección de la pareja se llevó a cabo por parte de las hembras, las cuales seleccionaron a los machos y sus cuevas más aptas para la reproducción, utilizando señales químicas, mediadas con o sin contacto entre individuos. Se observó un comportamiento de cuidado de pre-cópula breve (24 h) en las cuevas con cámaras, el cual fue iniciado por las hembras cercanas a volverse receptivas. El tiempo de cópula dependió del área de estudio (LMC y SAO), de la relación operacional de sexos (ROS) y de si las hembras habían copulado recientemente con otro macho, aunque fue independiente de la talla de los machos. Existió un cuidado post-copulatorio exitoso que dependió de diversos factores de acuerdo al área de estudio. En LMC, dependió de la presencia de cuevas y de la duración de la receptividad de las hembras, aunque fue independiente de la ROS y de la talla del macho. En SAO, dependió de la duración de la receptividad de las hembras y de la ROS, aunque fue independiente de la presencia de cuevas y de la talla del macho. Los resultados aquí presentados demuestran que existe una importante influencia de las condiciones físico-biológicas del área de estudio que modulan en gran medida el sistema de apareamiento y las estrategias reproductivas desarrolladas por ambos sexos.

Abstract

The mating system of a species reflects the pattern of mate monopolization in space and time. It consists of sex-specific strategies used to increase the offspring fitness which depends on the habitat characteristics. In the present thesis, it was found that the mating system of *Neohelice granulata* is based on the defense of the resource “burrows”, being the large males who constructed burrows with chambers, close in Laguna Mar Chiquita (LMC) and open in San Antonio Oeste (SAO), in which the copula can occur. Small males developed different mating strategies to copulate with females: copulating on the surface or getting into empty large male’s burrows. Regarding receptive females, two types were found: with short and extended receptivity. In the former, the seminal receptacle (SR) was full of sperm and females always laid eggs, while in the latter, the SR was empty and females did not lay eggs. This capacity of females to control the moment of egg-laying was attributed to different reproductive strategies related to the presence of [1] a vulvae opercula which becomes mobile in receptive females due to a decalcification process, [2] secretions of the SR which would allow maintaining the sperm stored viable, and [3] a special tissue at the junction of the oviduct and the SR which would determine the moment of ovulation. Mate choice was conducted by females, selecting the more appropriate males and their burrows for the mating purposes, and using chemicals signals mediated with or without contact between partners. A short post-copulatory guarding behavior was observed (24 h) inside the burrows chambers, which was initiated by females who were close to become receptive. The copulating time depended on the study area (LMC y SAO), the operational sex ratio (OSR) and whether the female had copulated recently with another male, although it was independent of male size. A successful post-copulatory guarding behavior was observed and depended on diverse factors according to the study area. In LMC, it depended on the presence of burrows and the duration of female receptivity, although it was independent of the OSR and the size of males. In SAO, it depended on the duration of receptivity and the OSR, although it was independent of the presence of burrows and the size of males. The results shown here demonstrate that there is an important influence of the physic and biological conditions of the study area, which modulate to a great extent the mating system and the reproductive strategies developed by both sexes



Capítulo I

Introducción General

Introducción general

Marco teórico

En la mayoría de las especies con reproducción sexual, las hembras producen un número limitado de ovocitos grandes ricos en nutrientes, mientras que los machos, por el contrario, producen grandes cantidades de espermatozoides más pequeños (Trivers 1972). Esta anisogamia es frecuentemente asociada con las diferentes estrategias que machos y hembras utilizan para aumentar su *fitness*. Se ha asumido que las hembras optimizan su éxito reproductivo al aparearse con gran cantidad de machos, incrementando la diversidad genética de su descendencia (Andersson 1994; Jennions y Petrie 2000), aunque estudios más recientes demostraron que tanto las hembras como su progenie se beneficiarían al ser éstas monógamas, y al elegir un único macho de “buenos genes” (Hunt et al. 2004; Jennions et al. 2007). En el caso de los machos, su éxito reproductivo sería maximizado al aparearse con la mayor cantidad de hembras posibles (Trivers 1972; Clutton-Brock y Parker 1992).

El sistema de apareamiento de una especie está caracterizado por las estrategias específicas que cada sexo utiliza para maximizar el *fitness* de su descendencia en un ambiente particular (Jormalainen 2007). Más específicamente, el sistema de apareamiento refleja el patrón de monopolización de la “pareja” en espacio y tiempo (Shuster y Wade 2003). Sobre la base de esta monopolización, Emlen y Oring (1977) establecieron la primer clasificación ecológica de los sistemas de apareamiento, de acuerdo con las formas de asociación generales entre ambos sexos: monogamia, poliginia y poliandria; y caracterizaron subtipos para algunos de ellos, tales como la defensa de recursos, defensa de hembras o y dominancia de machos mediante la formación de agregaciones. Las estrategias diferenciales de machos y hembras utilizadas en la formación de la pareja o el par apareado¹, conjuntamente con la competencia entre individuos del mismo sexo por el acceso a la pareja, conlleva al proceso de selección sexual (Shuster y Wade 2003).

Shuster (2007) señala que el estudio de los sistemas de apareamiento comprende dos aspectos centrales: [1] la fuente que promueve la selección sexual y, [2] la intensidad de la misma. Como resultado, la selección sexual no sólo contribuye al desarrollo de caracteres sexuales secundarios morfológicos, fisiológicos y

¹ Si bien el término de “pareja” se utiliza frecuentemente en las asociaciones de monogamia, mientras que el de “par apareado” se utiliza más estrictamente para caracterizar las asociaciones de poligamia, en la presente tesis, se utilizarán indistintamente ambos términos.

comportamentales, sino que, además, favorece la especiación (Chapman et al. 2003; Shuster y Wade 2003). Además, la selección sexual comprende numerosos procesos como el conflicto intersexual de intereses (entendido como el conflicto entre machos y hembras de aparearse con un único individuo de “buena calidad” o con varios pero de menor calidad), la competencia intra-sexual (de machos y hembras por obtener la pareja de mejor calidad, la cual ocurre generalmente entre machos), la selección de la pareja, y los mecanismos sensoriales utilizados en estos procesos. El objetivo de los estudios realizados en esta temática es entender cómo ocurre la selección sexual, es decir, reconocer los procesos que se encuentran involucrados y bajo qué circunstancias ambientales operan (Andersson 1994; Kokko et al. 2002; Chapman et al. 2003). Recientemente, se ha establecido que estos procesos ocurren simultáneamente y que existen interacciones entre ellos que modulan el desarrollo de diversas estrategias reproductivas (Arnqvist y Rowe 2005; Cordero y Eberhard 2005; Kokko 2005).

En ambos sexos, las estrategias reproductivas involucradas en las decisiones de apareamiento parecerían estar basadas en la disponibilidad de las oportunidades de apareamiento, la calidad de la pareja y las condiciones del ambiente (Thiel y Duffy 2007). Específicamente en los crustáceos decápodos, la estrategia de las hembras consistiría en maximizar la probabilidad de fecundación de sus ovocitos mediante el mantenimiento del receptáculo seminal con la mayor cantidad de espermatozoides viables. En el caso de los machos, consistiría en la ocupación de la mayor parte del receptáculo seminal de la hembra con espermatozoides ubicado en una posición en la cual se maximicen las probabilidades de fecundación de los ovocitos (McLay y López Greco 2011). Como resultado, el éxito reproductivo de ambos sexos depende de estrategias de comportamiento y apareamiento distintas.

En las estrategias reproductivas de los crustáceos existen también diferencias intra-sexuales. Por ejemplo, la talla es el factor principal que frecuentemente determina el éxito reproductivo en los machos dado que en muchos estudios se demostró que machos maduros tanto de talla grande como chica exhiben distintas estrategias (e. j. Abele et al. 1986; Jivoff 1997a, Sainte-Marie et al. 1999; Kamio et al. 2003). En el caso de las hembras, si bien se caracterizaron casos extremos en decápodos sociales relacionados con la presencia de castas y hembras “reinas” y “subordinadas”, como por ejemplo en el cangrejo *Metopaulias depressus* (Diesel y Schubart 2007) y en el camarón *Synalpheus regalis* (Duffy 2007); se asume que, por el contrario, generalmente no

desarrollarían adaptaciones morfológicas ni comportamentales diferenciales, aunque sí se ha observado que presentan un interés diferente por ciertos machos (Hinojosa 2001; Díaz 2002, Correa y Thiel 2003). Sin embargo, estudios recientes demostraron la existencia de estrategias reproductivas diferenciales intra-sexuales asociadas al estado reproductivo de la hembra (Brockerhoff y McLay 2005a).

Las estrategias de comportamiento utilizadas por los individuos para obtener una pareja, y los conflictos intra e inter-sexuales involucrados en las mismas, modelan los sistemas de apareamiento en un ambiente en el cual las condiciones ecológicas tales como la abundancia y distribución de recursos y hembras receptivas son limitadas (Emlen y Oring 1977; Shuster y Wade 2003). Con posterioridad y en base a los tipos de sistemas de apareamiento propuestos por Emlen y Oring (1977), Christy (1987) propuso una nueva clasificación para describir los casos específicos de los cangrejos Brachyura. Este autor definió tres tipos principales de sistemas de apareamiento en base a la forma de competencia entre machos por el acceso a las hembras y la elección de machos por parte de las hembras. Dos de ellos, categorizados como “competencia centrada en hembras” y “competencia centrada en recursos” son similares a los establecidos por Emlen y Oring (1977), mientras que establece un tercer tipo denominado “competencia centrada en la tasa de encuentros”. Los tres tipos de asociaciones han sido asignadas a muchos cangrejos grapsóideos (ver Brockerhoff y McLay 2005b).

Específicamente, respecto del tipo de sistema de apareamiento “competencia centrada en recursos”, se describieron pocas especies de grapsóideos que presenten este tipo de asociación, como por ejemplo *Pachygrapsus transversus* y (Abele et al. 1986) y *Sesarma reticulatum* (Seiple y Salmon 1982; Zimmerman y Felder 1991), considerado siempre al refugio como el recurso defendido (ver Brockerhoff y McLay 2005c). Las cuevas constituyen importantes recursos que proveen refugio contra la depredación y/o contra las condiciones físicas del ambiente (Richardson 2007). Adicionalmente, se ha propuesto que, para algunas especies de cangrejos, las características del hábitat disponible para la construcción de una cueva influyen el sistema de apareamiento de la especie, constituyendo una adaptación al ambiente particular en el cual viven (Seiple y Salmon 1982; Abele et al. 1986; Christy 1987; Lindberg y Stanton 1989). En estudios realizados sobre diversas especies de ocapódidos, en los cuales se realizaron comparaciones entre compararon características morfológicas de las cuevas de los

machos, los resultados obtenidos indicaron que la forma de la cueva tiene, un efecto en el apareamiento donde son las hembras las que eligen a los machos (Backwell y Passmore 1996; deRivera 2005).

La forma de competencia entre machos para la monopolización de las hembras que caracteriza el sistema de apareamiento de una especie depende, además, del modo en que ocurre ese apareamiento. En los Brachyura, éste puede [1] estar restringido al período de muda, cuando las hembras receptivas se encuentran morfológicamente capaces de copular, como el apareamiento post-muda observado en portúnidos y cáncrios, o [2] cuando el opérculo de la vulva de las hembras receptivas se vuelve móvil temporalmente, durante el período de inter-muda, como ocurre en algunos ocipódidos y grapsóideos (McLay y López Greco 2011).

El tiempo y la duración de la receptividad de las hembras son importantes dado que determinan la relación operacional de sexos (ROS, definida como la relación entre la cantidad de hembras fertilizables y la cantidad de machos sexualmente maduros en un período de tiempo dado, Emlen y Oring 1977). Cuando las hembras se vuelven receptivas asincrónicamente, la ROS se desvía a favor de los machos, ocurre una fuerte competencia entre ellos y aumenta el potencial de la selección sexual (Orensanz et al. 1995; Correa y Thiel 2003).

La duración de la receptividad de las hembras depende de diversos factores, tanto externos como internos, incluyendo entre los primeros a la temperatura y/o el ciclo lunar (Flores y Negreiros-Fransozo 1998; Henmi y Murai 1999) y, entre los segundos, al desarrollo de los ovarios y la muda (DeKleijn 1998). Además, se ha demostrado que algunas hembras de crustáceos pueden controlar el período de su receptividad (Brockhoff y McLay 2005b; Cowan y Atema 1990; Thiel y Hinojosa 2003). El período de receptividad se encuentra intrínsecamente relacionado con la forma de cerramiento de la vulva. En las hembras de los Brachyura existen tres tipos de forma de oclusión de la vulva: [1] un gonoporo cuyo cierre y apertura se efectúa por simple acción muscular, [2] un opérculo siempre móvil que cubre el gonoporo, y [3] un opérculo fijo que cubre el gonoporo, sólo móvil durante determinados períodos, cuando la hembra se encuentra receptiva (Hartnoll 1968, 2006; Thompson y McLay 2005). El estudio del tipo de morfología de la vulva es importante dado que es uno de los caracteres que define el tipo de sistema de apareamiento que presentará la especie.

En un trabajo de revisión sobre los mecanismos de selección sexual, Harvey y Bradbury (1991) indicaron que el apareamiento no es aleatorio dado que existe un proceso de elección de la pareja por parte de alguno de los sexos y que existe competencia por ese acceso. Para un mejor entendimiento de cómo ocurre el proceso de selección sexual, se requiere conocer los mecanismos utilizados por los individuos de ambos sexos en la elección de la pareja. En muchas especies, la selección sexual fue tradicionalmente considerada como la competencia directa entre machos y la elección de éstos por parte de las hembras (Darwin 1871; Bateman 1948; Trivers 1972). Sin embargo, algunos estudios registraron el caso opuesto (Berglund et al. 1996; Reading y Backwell 2007). En los cangrejos braquiuros, la elección de la pareja depende de diversos factores como el tamaño del cuerpo o de la quela de los machos, o el estado reproductivo de las hembras, o de la emisión de sustancias químicas como las feromonas al agua, y/o la emisión de señales visuales, acústicas o táctiles, para atraer a la pareja (Thiel y Duffy 2007). La elección de la pareja mediante el uso de diversas señales por uno u otro sexo varía entre especies y depende del contexto social de cada una de ellas (Borowsky 1985; Kamio et al. 2000, 2002; Raethke et al. 2004).

Como parte del contexto social, los cangrejos *Brachyura* exhiben estrategias en el comportamiento de apareamiento complejas y difieren ampliamente en términos del modo de competencia entre machos por el acceso a las hembras receptivas. En los cangrejos *grapsoidea* los machos buscan y cuidan activamente a las hembras promoviendo la competencia intra-sexual que se hace evidente físicamente a través de los encuentros agonísticos. Las interacciones agonísticas ocurren generalmente entre machos, cuando los individuos pelean por recursos como la pareja, el alimento o los refugios. Los individuos dominantes son quienes, generalmente, mantienen un control prolongado sobre recursos ecológicos críticos, lo cual resulta en una mayor cantidad de apareamientos y en un éxito reproductivo mayor (Ellis 1995).

Además de la disputa física entre machos, éstos también compiten en términos de competencia espermática, cuando las hembras son copuladas por más de un macho y el esperma proveniente de distintos individuos compite en el receptáculo seminal de la hembra por fertilizar a los ovocitos (Parker 1970). El receptáculo seminal es el sitio en el cual una eventual competencia espermática debería ocurrir, cuando se acumula esperma proveniente de distintos machos (Orensanz et al. 1995; Sainte-Marie 2007).

De acuerdo a la conexión que existe entre el ovario-oviducto y el receptáculo seminal, Diesel (1991) caracterizó los receptáculos seminales de los Brachyura en dos tipos morfológicos: dorsal y ventral. En el tipo dorsal, el oviducto se conecta dorsalmente con el receptáculo seminal, en el lado opuesto al conducto vaginal, de este modo, el primer macho en copular a la hembra es el que tiene mayor probabilidad de fecundar a los ovocitos. En el tipo ventral, el oviducto se comunica ventralmente con el receptáculo seminal, cerca de la conexión con el conducto vaginal, así, el último macho en copular a la hembra es quien tendría la mayor ventaja de fecundar a los ovocitos. El riesgo de competencia espermática dentro del receptáculo seminal puede ser disminuido mediante el desarrollo de comportamientos de cuidado de la hembra pre y post-copulatorios por parte de los machos (Jivoff 1997b).

El cuidado de la pareja es un comportamiento ampliamente distribuido en distintos taxa, sugiriendo una importante función en el éxito de apareamiento de los machos (Ridley 1983; Smith 1984). Estos tipos de comportamientos se encuentran influenciados por factores socio-sexuales y son altamente flexibles (Rondeau y Sainte-Marie 2001; Sainte-Marie et al. 2008). En el caso de los comportamientos de cuidado pre-copulatorios, éstos permiten que los machos cuiden a las hembras hasta que éstas entren en receptividad (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983; Jivoff 1997a). Por el otro lado, los comportamientos post-copulatorios tienden a evitar que otros machos se apareen con las hembras inseminadas, y a aumentar la probabilidad de que su esperma fecunde los ovocitos de la hembra (Parker 1970). Las condiciones sociales variables, incluyendo la relación operacional de sexos, la tasa de encuentro de las potenciales parejas, el número de competidores potenciales, la talla de los mismos y la relativa habilidad competitiva en la obtención de la pareja, afectarían la decisión del macho respecto del tiempo de cuidado de la hembra (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983; Yamamura 1987; Elwood y Neil 1992; Chapman y Kramer 1996).

Antecedentes de la especie

Neohelice granulata (Dana, 1851) es un cangrejo semiterrestre cavador y es considerada una especie clave de las planicies desnudas y de marisma de América del Sur, desde el norte de la Patagonia, Argentina (42°25'S; 64°36'O), hasta Río de Janeiro, Brasil (22°57'S; 42°50'O) (Spivak 2010). Se distribuye en grandes densidades en hábitats de variada salinidad, temperatura y patrones de marea, habitando tanto las

planicies dominadas por el pasto marino *Spartina* como las planicies intermareales desnudas (Spivak et al. 1994; Spivak 1997; Luppi et al. 2012). Las cuevas pueden alcanzar altas densidades, hasta 60 cuevas por m² (Iribarne et al. 1997). Si bien *N. granulata* es una de las especies más estudiadas en el mundo (Spivak 2010), no se han realizado estudios describiendo el tipo de sistema de apareamiento. Por otro lado, algunos estudios han comparado el efecto de las condiciones ambientales diferenciales sobre aspectos reproductivos de diferentes poblaciones. En este sentido, dos poblaciones de *N. granulata* de la costa Argentina, que se encuentran alejadas entre sí 800 km, y que habitan ambientes con características físicas diferentes, fueron estudiadas: La Laguna de Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO) (Fig. 1.1a, b, c, d, e).

En dichos estudios que compararon ambas poblaciones, se consideraron aspectos reproductivos y se identificaron diferencias relacionadas al tipo de hábitat, como por ejemplo, un retraso en la vitelogénesis secundaria en hembras de SAO debido a lo cual la estación reproductiva comienza más tarde (noviembre) respecto de la población de Mar Chiquita (septiembre) (Ituarte et al. 2006); o una fecundidad mayor en LMC mientras que el volumen de los huevos y de las larvas es mayor en SAO (Bas et al. 2007, 2008); características que estarían asociadas a una oferta alimentaria diferencial entre áreas de estudio, dado que la cantidad de materia orgánica encontrada en el sedimento barroso de LMC es mucho mayor (Bas et al. 2005). Sin embargo, el modo en el cual las condiciones del hábitat, como el tipo de sedimento, el tiempo de exposición durante marea baja, afectan el sistema de apareamiento y las estrategias reproductivas desarrolladas por ambos sexos no han sido estudiadas con anterioridad al presente estudio.

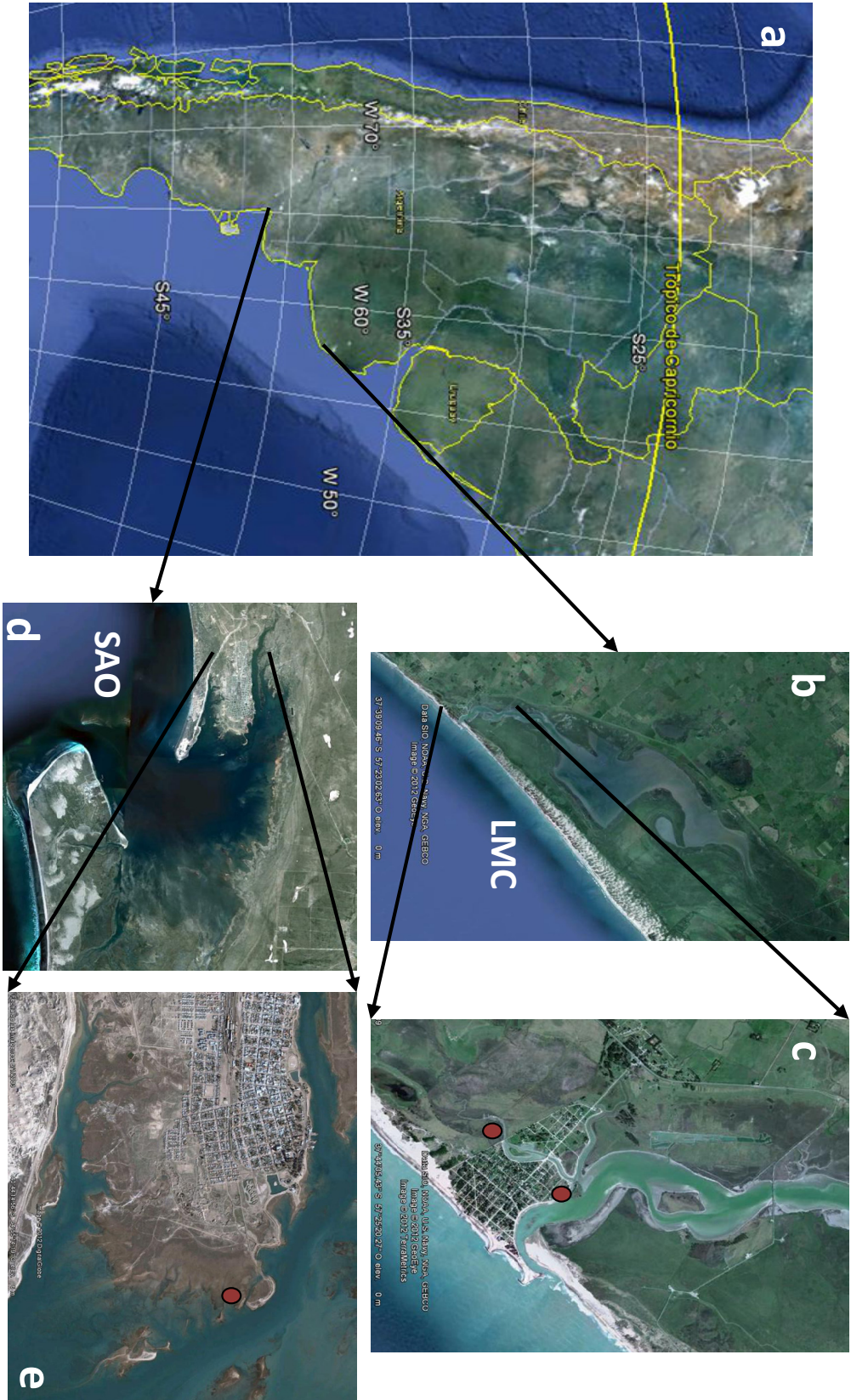


Fig. 1.1a. Imagen satelital de Argentina mostrando la ubicación geográfica de ambas áreas de estudio, alejadas entre sí 800 km: **b.** Laguna de Mar Chiquita (LMC) y, **d.** San Antonio Oeste (SAO). **c** y **e.** Los puntos rojos indican los lugares de colecta de especímenes y experimentación.

Áreas de estudio

La LMC se encuentra ubicada en la provincia de Buenos Aires ($37^{\circ}32'S$; $57^{\circ}19'O$), y constituye un ambiente estuarial oligo-polihalino (Fig. 1.1b). Es un cuerpo de agua dulce (46 km^2), con un régimen de micro mareas semi-diurno (0.3 - 1 m de amplitud), permanentemente conectada con el mar a través de un canal angosto de 5 km de longitud (Reta et al. 2001). El promedio de lluvias es de 800 mm al año (Luppi et al. 2012). La zona del intermareal alto presenta los pastos marinos *Spartina densiflora* y *Sarcocornia perennis* (Isacch et al. 2006), mientras que el intermareal medio y bajo presentan una planicie desnuda (Fig. 1.2a). Los cangrejos construyen sus cuevas en el intermareal alto y medio. Las cuevas en la planicie desnuda presentan una menor longitud respecto de las construidas en la planicie de espartillar (Iribarne et al. 1997). En ambas áreas, la profundidad de las cuevas alcanza el nivel de agua subterránea (Fanjul et al. 2008). Los sedimentos son finos, con bajo (planicie con espartillar) o nulo contenido de grava (planicie desnuda) y con alta penetrabilidad y contenido de materia orgánica. Un esquema de la ubicación, profundidad de las cuevas y características del sedimento se muestra en la Figura 3a (modificados de Luppi et al. 2012).

La Bahía de SAO (80 km^2) se encuentra ubicada en el noroeste del Golfo San Matías, en la provincia de Río Negro ($40^{\circ}46'S$, $64^{\circ}50'O$) y constituye un sistema eu-hiperhalino (Fig. 1.1c). Es una marisma seca, sin ingreso de agua dulce, a excepción de las escasas lluvias (en promedio, 240 mm/año) (Luppi et al. 2012). Presenta un régimen de macro mareas semi-diurno (hasta 9 m de amplitud) (Luppi et al. 2012). El intermareal alto se encuentra dominado por *S. perennis*, mientras que el intermareal medio presenta alternativamente planicies desnudas o dominadas por *S. alterniflora* (Isacch et al. 2006) (Fig. 1.2b). Los cangrejos ocupan ambas zonas del intermareal, alcanzando una densidad de $130 \text{ cangrejos m}^{-2}$ (Bas et al. 2005). En ambas áreas, las cuevas son poco profundas y no se encuentran conectadas con el nivel de agua subterránea (Luppi et al. 2012). El contenido de materia orgánica en los sedimentos (espartillar mayor que planicie desnuda) y la penetrabilidad (espartillar menor que planicie desnuda) son bajos y el contenido de grava es alto (espartillar menor que planicie desnuda). Un esquema de la ubicación, profundidad de las cuevas y características del sedimento se muestra en la Figura 3b (modificados de Luppi et al. 2012).

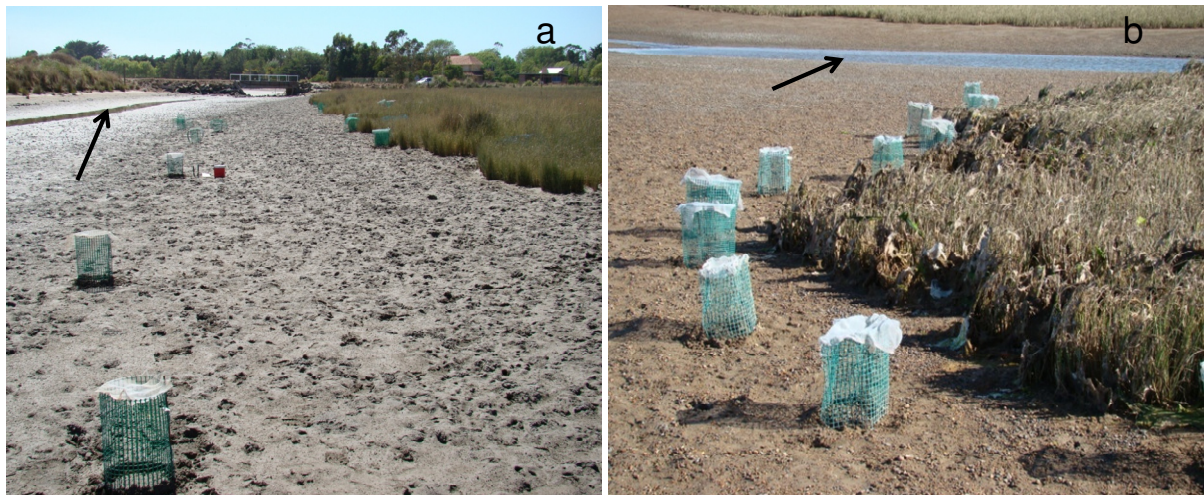


Fig. 1.2. Imágenes mostrando la planicie desnuda, el esparrillar y el canal de marea (flecha) durante marea baja en: **a.** Laguna Mar Chiquita. **b.** San Antonio Oeste. Además, en ambas imágenes se observan las cajas de exclusión utilizadas en diversos experimentos (ver capítulo II).

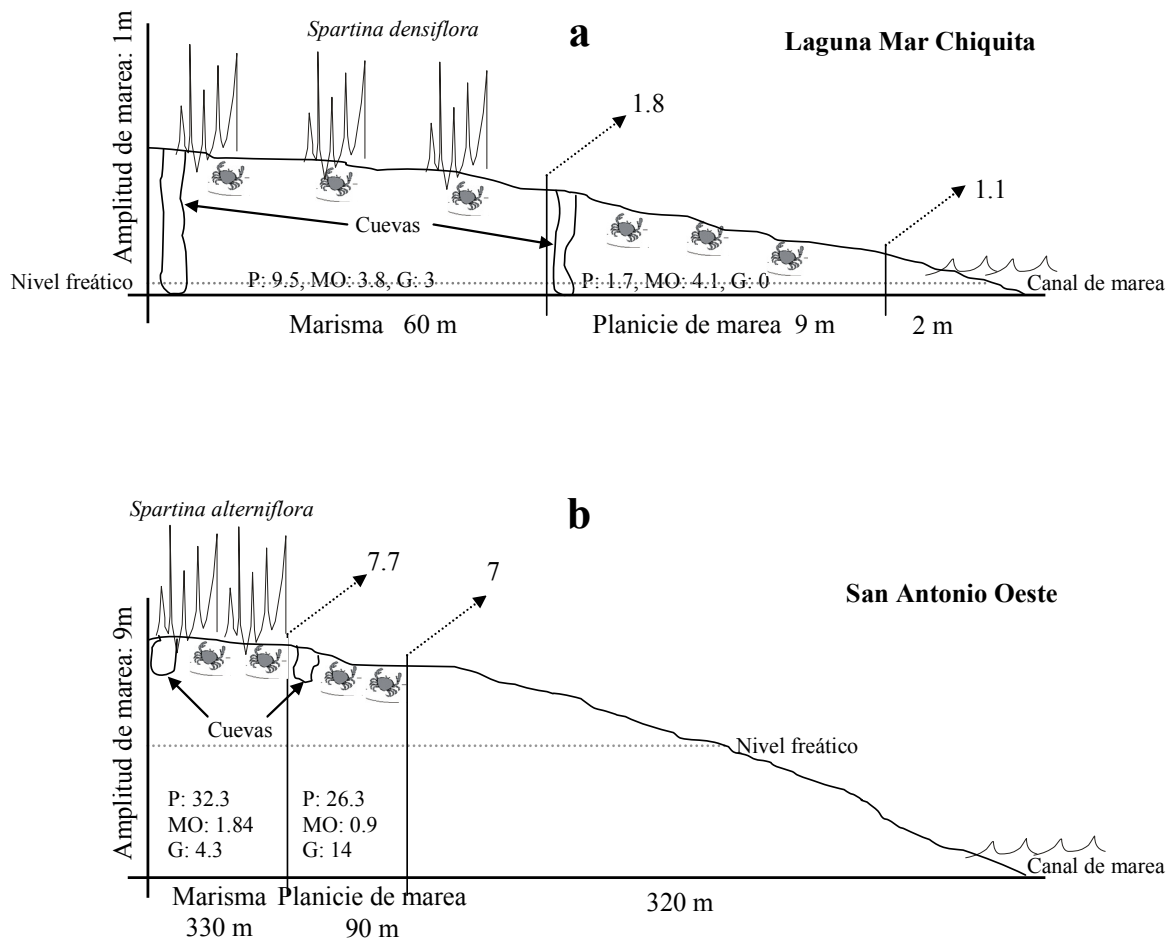


Fig. 1.3. Representación esquemática de cada área de estudio. **a.** Laguna de Mar Chiquita. **b.** San Antonio Oeste. MO: materia orgánica (en porcentaje), G: grava (en porcentaje), P: penetrabilidad ($K_p \text{ cm}^{-2}$).

Hipótesis

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la hipótesis general de la presente tesis establece que: las estrategias reproductivas y el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata* varían entre poblaciones que se encuentran en ambientes diferentes: LMC y SAO. Como hipótesis derivadas se establece que:

- [1] el sistema de apareamiento está basado en la defensa de recursos (cuevas),
- [2] las hembras presentan diversas estrategias relacionadas con la duración de su receptividad, la morfología de la vulva y la anatomía del receptáculo seminal para maximizar su éxito reproductivo,
- [3] la elección de la pareja se lleva a cabo por parte de las hembras utilizando distinto tipo de señales, y
- [4] el comportamiento reproductivo de los machos varía de acuerdo a diversos factores como la ROS, la talla del macho, la historia de apareamiento de la hembra (si copuló o no recientemente con otro macho), la duración de la receptividad de las hembras, y la presencia de cuevas.

Objetivos

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue estudiar las estrategias reproductivas y el sistema de apareamiento del cangrejo estuarial *Neohelice granulata* en dos ambientes con características físico-biológicas diferentes: LMC y SAO. Como objetivos particulares se planteó estudiar:

- [1] si el sistema de apareamiento está basado en la defensa del recurso “cuevas”,
- [2] las diversas estrategias reproductivas desarrolladas por las hembras para maximizar su éxito reproductivo,
- [3] cuál es el sexo que selecciona a la pareja y qué tipo de señales están involucradas en la elección de la pareja, y
- [4] el comportamiento reproductivo de los machos en laboratorio considerando diversos factores como la talla del macho, la ROS, la duración de la receptividad de las hembras, la presencia de cuevas y la historia de apareamiento de la hembra (si copuló o no recientemente con otro macho).

Capítulo II

**Sistema de apareamiento de *Neohelice granulata*:
efecto de la arquitectura de la cueva**

El presente capítulo está publicado en: Sal Moyano MP; Gavio MA; Luppi T. 2012. Mating system of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae) in two contrasting environments: effect of burrow architecture. *Marine Biology* 159: 1403-1416. DOI:10.1007/s00227-012-1917-6

Sistema de apareamiento de *Neohelice granulata*: efecto de la arquitectura de la cueva

Introducción

El sistema de apareamiento de una población depende de las estrategias de comportamiento utilizadas por los individuos en la obtención de una pareja, en el contexto de condiciones ecológicas limitadas, como la abundancia y distribución de recursos (Emlen y Oring 1977). Para una determinada especie, la naturaleza de la asociación sexual entre machos y hembras está determinada por la competencia intra-sexual y la elección de la pareja. Estas asociaciones varían considerablemente creando una relevante diversidad de sistemas de apareamiento (Thornhill y Alcock 1983). De acuerdo a las clasificaciones generales de los sistemas de apareamientos descritas por Emlen y Oring (1977) y, posteriormente por Christy (1987) para el caso específico de cangrejos braquiura, basadas en la forma de competencia entre machos por el acceso a las hembras y la elección de éstos por parte de las hembras (ver detalle en el capítulo I), en el presente capítulo nos centraremos en el sistema de apareamiento “competencia centrada en recursos”.

Respecto del tipo de sistema de apareamiento “competencia centrada en recursos”, las cuevas constituyen importantes recursos que primariamente proveen refugio contra la predación en especies acuáticas, y en las semi-terrestres, contra las condiciones físicas extremas (Richardson 2007). Sumado a esto, en muchas especies de cangrejos, la distribución de recursos o el tipo de hábitat usado para la construcción de una cueva, juegan una función importante en el apareamiento como una adaptación al ambiente particular en el cual viven (Seiple y Salmon 1982; Salmon 1983; Wirtz y Diesel 1983; Abele et al. 1986; Christy 1987; Lindberg y Stanton 1989). En estudios detallados que describen la arquitectura de las cuevas, se ha demostrado que las mismas varían de acuerdo a la diferente composición del sedimento (Morrissey et al. 1999; Katrak et al. 2008; Li et al. 2008; Needham et al. 2010). Por otro lado, muchos estudios realizados en ocapódidos, muestran que la forma de las cuevas es diferente entre sexos, teniendo la cueva de los machos una cámara ensanchada terminal donde ocurre el

apareamiento (Christy 2007). Además, comparaciones entre las características de las cuevas de los machos, indican que su forma tiene un efecto sobre la elección de éstos por parte de las hembras (Backwell y Passmore 1996; deRivera 2005). En cangrejos grapsoidea, algunos estudios han registrado que el apareamiento ocurre tanto en superficie, como así también, en el interior de las cuevas (Seiple y Salmon 1982; Brockerhoff y MacLay 2005b). Sin embargo, la estructura detallada de las mismas no fue caracterizada ni relacionada con el sexo del individuo que la construyó ni con las estrategias reproductivas.

Las asociaciones en el apareamiento son el resultado de un proceso complejo en el cual tanto las estrategias reproductivas como el comportamiento de apareamiento desarrollados por ambos componentes de la pareja juegan una función importante (Brockerhoff y McLay 2005a). Los cangrejos grapsoidea exhiben una considerable diversidad de estrategias reproductivas en las cuales los machos activamente buscan y cuidan hembras promoviendo la competencia intra-sexual, por ejemplo, a través de los encuentros agonísticos. Las interacciones agonísticas ocurren cuando los individuos pelean por recursos como la pareja, la comida o los refugios. Los individuos dominantes pueden obtener y mantener un control prolongado sobre recursos ecológicos críticos, lo cual resulta en una mayor cantidad de apareamientos y en un éxito reproductivo mayor (Ellis 1995). Como consecuencia, las cuevas podrían ser importantes recursos utilizados para el apareamiento, siendo defendidas por los machos y, de esta manera, promoviendo la competencia intra-sexual.

Además de la competencia física típica entre machos descrita en el párrafo anterior, los mismos pueden competir en términos de competencia espermática, cuando el esperma proveniente de distintos machos se mezcla en el receptáculo seminal de la hembra y los espermatozoides compiten por fecundar a los ovocitos (Parker 1970). De acuerdo a la conexión que existe entre el ovario y el receptáculo seminal, Diesel (1991) caracterizó los receptáculos seminales de los Brachyura en dos tipos morfológicos: dorsal y ventral (descriptos en detalle en el capítulo I). En el tipo dorsal, el primer macho en copular a la hembra es el que tiene mayor probabilidad de fecundar a los ovocitos, mientras que en el tipo ventral, el último macho en copular a la hembra es quien tendría la ventaja.

El riesgo de competencia espermática dentro del receptáculo seminal puede ser disminuido mediante el desarrollo de comportamientos de cuidado de la hembra post-copulatorios por parte de los machos (Jivoff 1997b). Estos comportamientos de cuidado post-cópula han sido observados y descritos en pocas especies de Grapsoidea como por ejemplo, *Hemigrapsus crenulatus* y *H. sexdentatus*, aunque esto podría deberse a la falta de estudios realizados en este grupo (Brockhoff y McLay 2005b). El desarrollo de un comportamiento de cuidado post-cópula ha sido considerado como un comportamiento adaptativo óptimo, el cual sería favorecido por la presencia de cuevas en las cuales las hembras podrían ser cuidadas y defendidas por los machos.

En el presente capítulo, se estudiaron ambas poblaciones de *Neohelice granulata* de la costa Argentina, la de la Laguna Mar Chiquita (LMC), y la de la Bahía de San Antonio Oeste (SAO). Debe hacerse especial referencia a las condiciones diferenciales del tipo y características del sedimento de ambas áreas de estudio, descritas y caracterizadas en detalle en el capítulo I (ver Fig. 1.3). El primer ambiente está compuesto por sedimentos finos (barro) con alta penetrabilidad, típico de un ambiente de baja energía; mientras que el segundo está compuesto por sedimentos de textura gruesa (grava) con baja penetrabilidad, típico de un ambiente de alta energía. Las cuevas alcanzan altas densidades y varían en tamaño, forma y condiciones físico-químicas, dependiendo del hábitat donde se construyan, planicie de *Spartina* o planicie desnuda (Olivier et al. 1972; Iribarne et al. 1997; Escapa et al. 2007; Fanjul et al. 2008; Silva et al. 2009). Si bien Iribarne et al. (1997) caracterizaron la forma de las cuevas en LMC, en SAO, no se han realizado caracterizaciones anteriormente, aunque observaciones de campo muestran que las mismas son más cortas y no conectadas con el nivel de agua subterránea. La presencia de las cuevas amortigua las condiciones físicas extremas durante la marea baja, cuando tanto la planicie con espartillar como la desnuda quedan descubiertas, disminuyendo los rangos de variación de temperatura y/o salinidad (Silva et al. 2009; Luppi et al. 2012).

Si bien se han realizado varios estudios en los cuales se compararon ambas poblaciones considerando aspectos reproductivos y se identificaron características diferenciales relacionadas al tipo de hábitat (descritas en detalle en el capítulo I; Bas et al. 2005, 2007, 2008; Ituarte et al. 2006); el modo en el cual las condiciones del hábitat, como el tipo de sedimento que afecta la arquitectura de las cuevas, influenciaría el

sistema de apareamiento y las estrategias reproductivas desarrolladas por ambos sexos, nunca han sido estudiadas con anterioridad al presente estudio.

Hipótesis

De acuerdo a la teoría de sistemas de apareamientos propuesta por Emlen y Oring (1977) y las asociaciones reproductivas entre machos y hembras de los *Brachyura* propuestas por Christy (1987), la hipótesis general del presente capítulo establece que *N. granulata* muestra un sistema de apareamiento basado en la defensa de recursos (considerando a las cuevas como recursos importantes, refugios, controlados por los machos), aunque el ambiente puede favorecer o desfavorecer estrategias de apareamiento particulares mediante su efecto sobre la estructura de las cuevas. Como hipótesis derivadas se establece que:

[1] machos y hembras construyen cuevas de distinta forma,

[2] la forma de las cuevas varía entre las áreas de estudio de acuerdo a la diferente granulometría y penetrabilidad del sedimento (características descritas en el capítulo I), y entre hábitats (planicie desnuda y de espartillar),

[3] los machos desarrollan un comportamiento de cuidado post-cópula que consiste en defender a las hembras dentro de las cuevas y así evitar la competencia espermática, y

[4] ocurren interacciones agonísticas entre machos en la defensa de sus cuevas y de las hembras.

Objetivos

En este contexto, el objetivo general de este capítulo fue caracterizar la arquitectura de las cuevas de *N. granulata* y evaluar su efecto sobre el sistema de apareamiento de la especie. Como objetivos particulares se planteó:

[1] estudiar si la forma de la cueva es diferente entre machos y hembras

[2] estudiar si la forma de la cueva varía entre áreas de estudio y entre hábitats,

[3] estudiar si existe un comportamiento de cuidado post-copulatorio asociado a la forma de la cueva, y

[4] estudiar si existen interacciones agonísticas entre machos por el acceso a las hembras y cuevas.

Materiales y métodos

Muestreo

El muestreo se realizó durante las estaciones reproductivas de 2008/2009 y 2009/2010 en LMC, y 2009/2010 en SAO. Los individuos fueron medidos con calibre, considerando al ancho de caparazón (AC) como la variable de referencia. Se consideraron sólo cangrejos funcionalmente maduros (>19 mm AC, López Greco y Rodríguez 1998). De acuerdo con estudios preliminares, se distinguieron distintas categorías de individuos para ambas áreas de estudio, LMC y SAO: [1] hembras ovígeras (HO), 23.4-31.7 mm AC en LMC y 22.3-27.5 mm AC en SAO; [2] hembras no ovígeras (HNO), 22.1-0.9 mm AC y 21-25.6 mm AC; [3] machos chicos (MC), 25.9-27.3 mm AC y 21.4-27.5 mm AC y; [4] machos grandes (MG), 34.3-36.2 mm AC y 28.1-34 mm AC; respectivamente.

Caracterización de las cuevas

La caracterización de las cuevas se realizó mediante dos métodos distintos, en ambos hábitats (planicie desnuda y planicie con espartillar) y en ambas áreas de estudio (LMC y SAO): [1] un muestreo de cuevas encontradas en transectas localizadas al azar, denominadas “cuevas al azar”, y [2] un experimento diseñado con el objetivo de asociar la forma de la cueva con la categoría de cangrejo que la construyó, denominadas “cuevas de exclusión”. El experimento consistió en localizar un individuo de cada una de las categorías (HO, HNO, MC y MG) en una caja de exclusión (30 cm de diámetro, enterrada 15 cm) construida con malla plástica (10 mm de apertura), localizadas en transectas en el área cubierta de cuevas, en pequeñas áreas sin cuevas, permitiendo que el cangrejo construya su cueva (Fig. 1.2, capítulo I). De acuerdo con los valores medios de profundidad de las “cuevas al azar” muestreadas en [1], las “cuevas de exclusión” fueron medidas diariamente hasta que alcanzaron medidas similares respecto de las cuevas al azar. De esta manera, las cuevas de exclusión fueron mantenidas entre uno y dos días en SAO, y entre seis y once días en LMC. Luego, las cajas fueron retiradas y las cuevas caracterizadas. Para la caracterización de ambos tipos de cuevas, al azar y de exclusión, los cangrejos fueron sacados sin modificar la forma de la cueva, medidos y sexados. Para obtener la forma de la cueva, se rellenó la misma utilizando espuma de

poliuretano expandido y luego de 30 min de secado, los moldes fueron excavados y transportados al laboratorio.

En el laboratorio, se midieron y se registró: los diámetros máximo y mínimo, la longitud de los moldes, y el número de entradas y ramificaciones de cada molde de cueva. Para reconocer la presencia de un ensanchamiento a modo de cámara en una cueva y diferenciarlo de las cuevas rectas, sin ensanchamientos, se calculó la diferencia entre el diámetro máximo y mínimo. Esta medida se utilizó como la variable dependiente, denominándosela “diferencia del ancho de la cueva”. Así, valores altos de dicha variable indicarían la presencia de una cámara, mientras que valores pequeños indicarían la presencia de cuevas rectas, independientemente de la talla de cangrejo. Se obtuvieron de nueve a 15 réplicas para cada categoría de cangrejo, para las cuevas al azar o de exclusión en ambos hábitats y en ambas áreas de estudio.

Se utilizaron modelos lineales generalizados (MLG) para testear simultáneamente los efectos e interacciones de diferentes factores independientes: hábitat (planicie desnuda o planicie con espartillar), categoría del individuo (HO, HNO, MC y MG), diseño experimental (cuevas al azar o de exclusión) y áreas de estudio (LMC y SAO); respecto de la variable dependiente “diferencia del ancho de la cueva”. Respecto de la variable dependiente “longitud de las cuevas”, se utilizaron MLG para testear los efectos e interacciones de esta variable respecto de los mismos factores independientes descriptos.

Para calcular la relación entre el número de días que un cangrejo utilizó en la construcción de una cueva y la longitud de la misma, como una medida del esfuerzo del cangrejo invertido en la construcción de su cueva, se tomaron dos sub-muestras, una de 26 y otra de 23 moldes de cuevas de exclusión (correspondientes a las cuatro categorías de individuos) obtenidos en LMC y SAO, respectivamente. Los valores de esfuerzo invertido en la construcción de cuevas fueron comparados entre áreas de estudio mediante un Test-t.

Experimentos de comportamiento de apareamiento: efecto de la forma de la cueva

Para evaluar experimentalmente la relación entre la forma de la cueva y el apareamiento, incluyendo el comportamiento de cuidado post-copulatorio, se realizó un experimento de exclusión en ambas áreas de estudio durante las estaciones reproductivas de 2009/2010 y 2010/2011. Los experimentos incluyeron MC, MG, cuevas con ensanchamientos y cuevas rectas, dispuestos en cuatro tratamientos (T):

[T1] un MC y una cueva recta,

[T2] un MG y una cueva con ensanchamiento,

[T3] un MC y una cueva con ensanchamiento y

[T4] un MG y una cueva recta.

Las cajas de exclusión (1 m², 15 cm profundidad) construidas con malla plástica (10 mm de apertura) fueron localizadas en la planicie desnuda. Todos los cangrejos encontrados en las cuevas encerradas dentro de las cajas de exclusión fueron removidos y, de acuerdo al tratamiento, las cuevas requeridas fueron dejadas intactas mientras que el resto fueron eliminadas rellenándolas con sedimento del ambiente. La presencia de cuevas rectas o con ensanchamientos fue distinguida manualmente utilizando una varilla de alambre. Para las cuevas con cámaras, se utilizaron solo aquellas que las poseían en su parte superior, dado que si la cópula ocurría dentro de la cueva, en la cámara, la misma podía reconocerse visualmente desde la superficie. De acuerdo al tratamiento, un MC o un MG, denominado como el “macho residente” fue colocado en la caja de exclusión, y se registró la ocupación de la cueva. Luego, se agregó una hembra receptiva, la cual fue reconocida por la presencia del opérculo móvil de la vulva (ver resultados capítulo III). El observador se encontraba localizado a 30 cm de la caja de exclusión, suficiente distancia que permitió observar a los individuos evitando afectar su comportamiento. Se registró el lugar donde ocurrió la cópula –dentro o fuera de las cuevas– y, aquellos casos en los cuales no se observó cópula, no fueron considerados. Una cópula fue considerada exitosa cuando se observó el pleon del macho y el de la hembra abiertos y los gonopodos del macho insertos en la vulva de la hembra. El número de machos que copuló dentro *versus* fuera de las cuevas fue registrado y comparado entre tratamientos y entre áreas de estudio a través de un análisis log-lineal (Norman y Streiner 1996; Zar 1999), considerando como hipótesis nula la

independencia entre el número de individuos copulando dentro de las cuevas y (1) el área de estudio, (2) los tratamientos. Para analizar si el número de machos que copuló dentro de las cuevas *versus* fuera de las mismas fue dependiente del tratamiento, se realizó un Test de Chi-cuadrado de independencia.

Una vez finalizada la cópula, la existencia de algún comportamiento de cuidado post-cópula se registró en cada experimento durante 1 h. Un comportamiento de cuidado post-cópula fue considerado exitoso cuando el macho logró retener a la hembra entre sus pereiópodos (cópula dentro o fuera de las cuevas) o bloqueó la entrada de la cueva previniendo que la hembra escapara hasta la finalización del experimento (cópula dentro de las cuevas). Se registró además, el lugar donde ocurrió el comportamiento de cuidado post-cópula –dentro o fuera de las cuevas–. El número de machos que desarrolló un comportamiento de cuidado post-cópula exitoso fue comparado entre tratamientos y entre áreas de estudio a través de un análisis log-lineal considerando la hipótesis nula de independencia entre el número de individuos que desarrollaron un comportamiento de cuidado post-cópula y (1) el área de estudio, (2) los tratamientos. Se realizó un Test-G posterior para analizar si las diferencias en el desarrollo de un comportamiento de cuidado post-cópula dentro o fuera de las cuevas fue dependiente del tratamiento.

Luego de que el primer macho hubiera copulado (y cuidado) exitosamente a la hembra, se agregó un segundo macho de talla similar al macho residente, reconocido como el “macho intruso”, y marcado con una mancha circular de esmalte de uñas de color localizada en el caparazón. El resultado a registrar de este experimento fue el siguiente: el macho –residente o intruso– localizado dentro de la cueva, o cuidando a la hembra, o ambas cosas luego de 1 h de observación, fue considerado el “ganador” del encuentro, mientras que el macho localizado fuera de la cueva o sin cuidar a la hembra fue considerado el “perdedor” del encuentro. Independientemente del tratamiento, luego de la adición del macho intruso, el número de machos –residentes *versus* intrusos– que ganaron los recursos “cuevas” o “hembras” fueron registrados y comparados mediante áreas de estudio utilizando un Test de Chi-cuadrado de independencia. En caso de encontrarse diferencias entre áreas de estudio, las frecuencias observadas y esperadas de machos residentes *versus* intrusos ganando cada recurso fueron comparadas utilizando un Test de Chi-cuadrado de adherencia. Independientemente del tipo de macho –

residente o intruso—, el número de machos total que ganó ambos recursos fue comparado entre áreas de estudio utilizando un Test de Chi-cuadrado (dado que pocos machos residentes en SAO ganaron ambos recursos, no se pudieron analizar estadísticamente las diferencias entre ambos tipos de machos y entre áreas de estudio).

El número y duración de los encuentros agonísticos entre machos residentes *versus* intrusos fue registrada y comparada entre áreas de estudio utilizando un Test-t luego de una transformación logarítmica de los datos. El número de encuentros agonísticos se refiere a cada vez que el par de machos tuvo contacto físico mediante la utilización de sus quelas y se separaron, mientras que la duración de los mismos, se refiere al tiempo total que el par invirtió en todos los encuentros en cada experimento. La mayoría de las interacciones agonísticas ocurrieron fuera de las cuevas o dentro de las cuevas pero cerca de la superficie y pudieron ser fácilmente cuantificadas. Sin embargo, en escasas ocasiones y durante pocos segundos ambos machos entraron profundamente en las cuevas por lo cual durante estos cortos períodos las interacciones no pudieron ser reconocidas. Se obtuvieron diez réplicas por tratamiento. Todos los experimentos fueron realizados durante marea baja en días soleados o nubosos y la temperatura varió entre 23°C–28°C.

Resultados

Variación en la forma de la cueva entre individuos y entre áreas de estudio

Respecto de la variable dependiente “diferencia del ancho de la cueva”, los MLG mostraron efectos significativos de los factores “categoría del cangrejo”, “diseño experimental” y “área de estudio”, mientras que no se encontró un efecto del “hábitat” (Tabla 1). El efecto significativo de “categoría del cangrejo” indicó que la forma de las cuevas varió entre individuos, en las cuevas al azar y de exclusión, en ambas áreas de estudio (Fig. 2.1). De esta forma, dos tipos de cuevas fueron identificadas en ambas áreas de estudio.

En LMC, las cuevas que presentaron un ensanchamiento a modo de “cámara”, ubicado en la parte superior o media de su longitud, fueron asociadas con los MG,

mientras que las cuevas rectas con forma de tubo se asociaron a los MC, HO y HNO (Fig. 2.2a).

En SAO, las cuevas presentaron una entrada ensanchada –a modo de cámara– o angosta continuando con la forma recta de tubo y fueron asociadas a MG o MC, HO y HNO; respectivamente (Fig. 2.2b). Una diferencia de tamaño entre el ancho máximo y mínimo de la cueva similar a 18 mm o mayor se consideró indicador de la presencia de un ensanchamiento o cámara para ambas áreas de estudio. Las diferencias de diámetro máximas y mínimas fueron 55 mm y 1.3 mm para LMC, y 29.7 mm y 0.1 mm para SAO, respectivamente.

Tabla 1. Modelo lineal generalizado mostrando el efecto de los factores independientes “hábitat”, “categoría del cangrejo”, “diseño experimental: cuevas al azar o de exclusión” y “área de estudio” y sus interacciones respecto de la variable dependiente “diferencia del ancho de la cueva”, definida como la diferencia entre el ancho máximo y mínimo de la cueva.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepto	53415,87	1	53415,87	771,62	***
(1) Hábitat	11,15	1	11,15	0,16	ns
(2) Categoría del cangrejo	16502,09	3	5500,70	79,46	***
(3) Diseño experimental	357,15	1	357,15	5,15	**
(4) Área de estudio	5457,42	1	5457,42	78,83	***
1 x 2	42,12	3	14,04	0,20	ns
1 x 3	0,11	1	0,11	0,00	ns
2 x 3	174,38	3	58,13	0,83	ns
1 x 4	346,24	1	346,24	5,00	**
2 x 4	373,62	3	124,54	1,79	ns
3 x 4	364,97	1	364,97	5,27	**
1 x 2 x 3	52,21	3	17,40	0,25	ns
1 x 2 x 4	294,04	3	98,01	1,41	ns
1 x 3 x 4	6,34	1	6,34	0,09	ns
2 x 3 x 4	228,40	3	76,13	1,09	ns
1 x 2 x 3 x 4	24,18	3	8,06	0,11	ns
Error	20905,94	302	69,22		

Valores p significativos: ** p<0.01, ***p<0.001

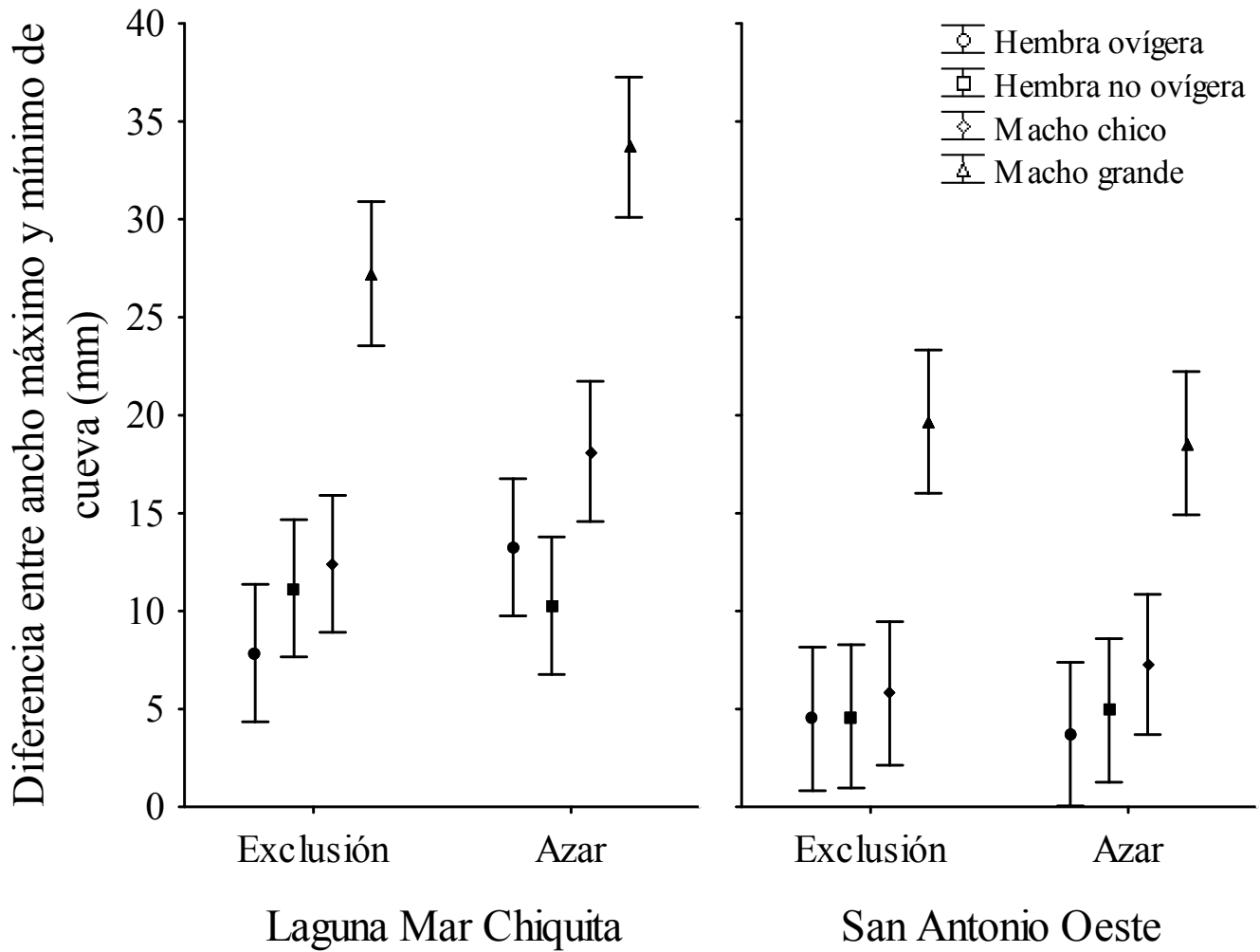


Fig. 2.1. Diferencia del ancho de la cueva (definida como la diferencia entre el ancho máximo y mínimo de la cueva) respecto de los factores independientes: “categoría del cangrejo” incluyendo hembras ovígeras, hembras no ovígeras, machos chicos y machos grandes, “diseño experimental” incluyendo cuevas al azar o cuevas de exclusión, y “área de estudio” incluyendo la Laguna de Mar Chiquita y San Antonio Oeste. (Los símbolos representan la media y las líneas verticales el desvío estándar).

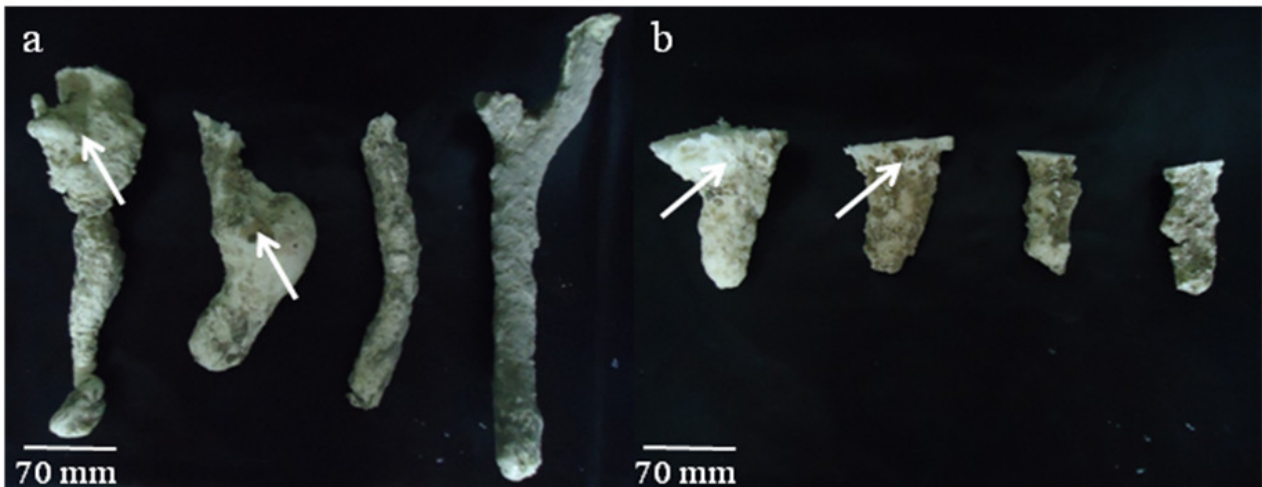


Fig. 2.2. Moldes de las cuevas de *Neohelice granulata*. **a.** Moldes de cuevas construidos en la Laguna de Mar Chiquita. Dos tipos de forma de cueva fueron encontrados: con un ensanchamiento a modo de cámara en la parte superior o media de la longitud de la cueva (ver flechas), o sin ensanchamientos, como tubos rectos. **b.** Moldes de cuevas construidos en San Antonio Oeste. Dos tipos de forma de cueva fueron encontrados: con una entrada ensanchada (ver flechas), y con una entrada recta.

El efecto significativo entre los factores “diseño experimental” y “áreas de estudio” mostró que los MG construyeron y ocuparon cuevas con cámaras (LMC) o entradas ensanchadas (SAO), mientras que las HO y HNO construyeron y ocuparon cuevas rectas en ambas áreas de estudio. Por el contrario, respecto de los MC se encontraron diferencias entre áreas de estudio: en LMC, se encontraron ocupando cuevas con cámaras en los muestreos al azar, pero construyeron cuevas rectas en los experimentos de exclusión; mientras que en SAO construyeron y ocuparon cuevas rectas (Fig. 2.1). Aunque no se encontró un efecto significativo del factor “hábitat”, la interacción significativa entre “hábitat” y “área de estudio” mostrada en la Tabla 1, indicó que hubo una pequeña diferencia en la variable “diferencia del ancho de la cueva” siendo mayor en el espartillar respecto de la planicie desnuda en LMC, mientras que en SAO no se encontraron diferencias.

Respecto de la variable dependiente “longitud de las cuevas”, los MLG mostraron un efecto significativo e interacción de los factores “hábitat” y “área de estudio”, mientras que no se encontró para “categoría del cangrejo” y “diseño experimental” (Tabla 2). Las diferencias entre hábitats fueron encontradas para LMC: las cuevas presentaron una mayor longitud en el espartillar respecto de la planicie

desnuda, mientras que en SAO no se encontraron diferencias (Fig. 2.3). Las diferencias entre áreas de estudio mostraron que las cuevas presentaron una mayor longitud en LMC respecto de SAO. El largo máximo y mínimo fue 779 mm y 240 mm para LMC y, 105 mm y 46 mm para SAO, respectivamente. Respecto del número de entradas y ramificaciones de los moldes, algunas cuevas de LMC presentaron una o dos ramificaciones, y en algunos casos dos entradas, mientras que las cuevas de SAO nunca presentaron ramificaciones ni más de una entrada.

Se encontraron diferencias respecto del esfuerzo de los cangrejos (calculado como la relación entre el número de días que el cangrejo tardó en construir una cueva y la longitud de la misma) requerido para la construcción de sus cuevas entre áreas de estudio: los individuos de SAO presentaron un mayor esfuerzo respecto de los de LMC ($t=3.93$, $p<0.001$, $LMC=0.014\pm 0.007$, $SAO=0.022\pm 0.01$).

Tabla 2. Modelo lineal generalizado mostrando el efecto de los factores independientes “hábitat”, “categoría del cangrejo”, “diseño experimental: cuevas al azar o de exclusión” y “área de estudio” y sus interacciones respecto de la variable dependiente “longitud de las cuevas”.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepto	25821670	1	25821670	3355,629	***
(1) Hábitat	432570	1	432570	56,214	***
(2) Categoría del cangrejo	18451	3	6150	0,799	ns
(3) Diseño experimental	2609	1	2609	0,339	ns
(4) Área de estudio	14343100	1	14343100	1863,943	***
1 x 2	6394	3	2131	0,277	ns
1 x 3	2679	1	2679	0,348	ns
2 x 3	4066	3	1355	0,176	ns
1 x 4	479357	1	479357	62,294	***
2 x 4	11203	3	3734	0,485	ns
3 x 4	1652	1	1652	0,215	ns
1 x 2 x 3	7229	3	2410	0,313	ns
1 x 2 x 4	8203	3	2734	0,355	ns
1 x 3 x 4	3581	1	3581	0,465	ns
2 x 3 x 4	4881	3	1627	0,211	ns
1 x 2 x 3 x 4	12037	3	4012	0,521	ns
Error	2308509	300	7695		

Valores p significativos: *** $p<0.001$

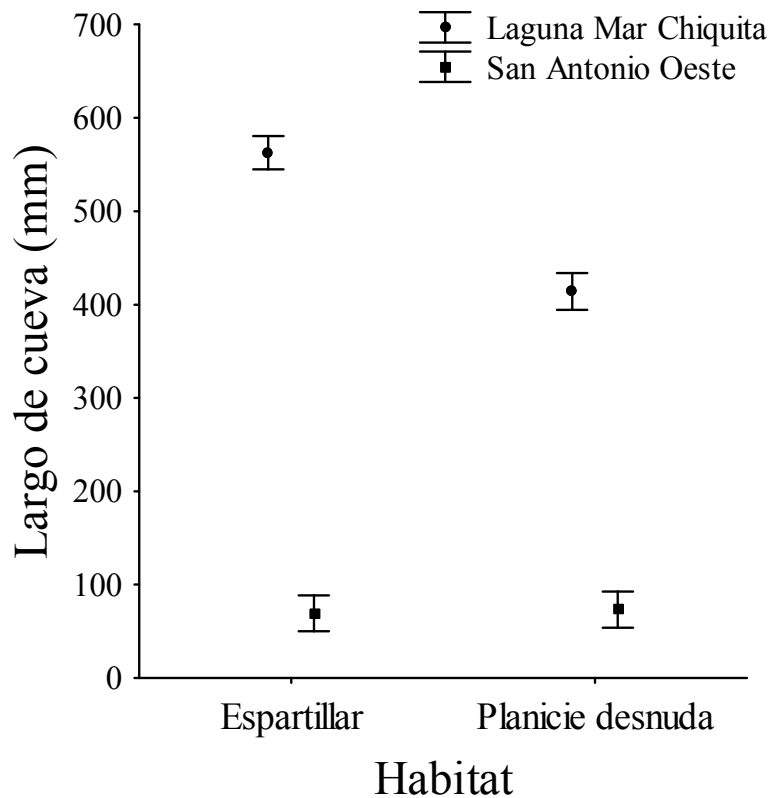


Fig. 2.3. Largo de la cueva (mm) respecto de los factores independientes: “hábitat”, incluyendo a la planicie desnuda y al espartillar, y “área de estudio”, incluyendo a la Laguna de Mar Chiquita y a San Antonio Oeste. (Los símbolos representan la media y las líneas verticales el desvío estándar).

Comportamientos de cópula y cuidado post-cópula y encuentros agonísticos: efecto de la forma de la cueva

El número de machos que copularon dentro *versus* fuera de las cuevas fue independiente del área de estudio ($\chi^2=0.55$, $p=0.45$), pero dependiente del tratamiento ($\chi^2=46.88$, $p<0.001$). Independientemente de la talla del macho (MC o MG), cuando la cueva presentó una cámara cerrada o entrada ensanchada (T2 y T3), la cópula ocurrió en las mismas; mientras que en presencia de cuevas rectas (T1 y T4), la cópula ocurrió fuera de las cuevas, en la superficie (LMC: $\chi^2=27.5$, $p<0.0001$; SAO: $\chi^2=19.48$, $p<0.001$) (Fig. 2.4a, b, c, d; Tabla 3).

El número de machos que mostró un comportamiento de cuidado post-copulatorio fue dependiente del área de estudio ($\chi^2=16.36$, $p<0.001$) y de los tratamientos ($\chi^2=41.04$, $p<0.001$). De acuerdo a esto, sólo los machos de LMC mostraron un comportamiento de cuidado post-cópula exitoso respecto de los de SAO

($\chi^2=13.22$, $p<0.001$). Consecuentemente, para los machos de LMC el desarrollo de un comportamiento de cuidado post-copulatorio dependió del tratamiento ($G=33.06$, $p<0.001$). En los T2 y T3, donde las cuevas presentaron una cámara y la cópula ocurrió dentro de las mismas, se observó igualmente un cuidado de post-cópula exitoso: los machos ocuparon la entrada de la cámara bloqueando la salida de las hembras (Fig. 2.4e, f; Tabla 3). En los T1 y T4, cuando la cópula ocurrió en superficie (Fig. 2.4g), los machos mantuvieron a las hembras entre sus pereiópodos o las transportaron tomándolas con sus quelas, aunque raramente mantuvieron el control sobre las mismas durante todo el tiempo experimental (Tabla 3).



Fig. 2.4. Cuevas de machos de *Neohelice granulata* y comportamiento de apareamiento. **a.** Un macho chico (flecha) en la entrada de una cueva recta, sin cámara, en la Laguna Mar Chiquita (LMC). **b.** Un macho grande (MG) en una cueva con cámara en la parte superior de la cueva en LMC. **c.** Caja de exclusión utilizada para los experimentos, el observador se localice a 30 cm de la misma. **d.** Un MG copulando con una hembra en una cámara de una cueva en LMC. **e.** Un MG con una hembra desarrollando un comportamiento de cuidado de la hembra post-copulatorio en una cámara de una cueva en LMC. **f.** Un MG desarrollando un comportamiento post-copulatorio de cuidado de la hembra dentro de una cueva, sosteniendo a la hembra con su quela e impidiéndole escapar en LMC. **g.** Un MG copulando con una hembra en la entrada ensanchada de una cueva en San Antonio Oeste. **h.** Pareja copulando fuera de las cuevas.

Tabla 3. Frecuencias observadas del número de individuos que copuló dentro o fuera de las cuevas en la Laguna de Mar Chiquita (LMC) y en San Antonio Oeste (SAO), y frecuencias observadas del número de individuos que desarrollaron un comportamiento de cuidado de la hembra post-copulatorio exitoso dentro o fuera de las cuevas o no lo desarrollaron, en LMC y SAO, en los tratamientos 1 (T1): un macho chico y una cueva recta, 2 (T2): un macho grande y una cueva con cámara, 3 (T3) un macho chico y una cueva con cámara y 4 (T4): un macho grande en una cueva recta.

Frecuencias observadas de individuos				
	T1	T2	T3	T4
MCL				
Cópula dentro de cuevas	0	9	7	0
Cópula fuera de cuevas	10	1	3	10
SAO				
Cópula dentro de cuevas	0	7	6	0
Cópula fuera de cuevas	10	3	4	10
MCL				
Cuidado post-copulatorio dentro de cuevas	0	9	8	0
Cuidado post-copulatorio fuera de cuevas	3	0	1	8
Sin cuidado post-copulatorio	7	1	1	2
SAO				
Cuidado post-copulatorio dentro de cuevas	0	4	3	0
Cuidado post-copulatorio fuera de cuevas	1	0	0	2
Sin cuidado post-copulatorio	9	6	7	8

Luego de la adición del macho intruso, existieron diferencias en el número de machos –residentes *versus* intrusos- que ganaron el recurso “cuevas” entre áreas de estudio ($\chi^2=6.19$, $p<0.05$, Fig. 2.5a). En LMC no existieron diferencias entre el tipo de macho que ganó la cueva ($\chi^2=0.9$, $p=0.34$), mientras que en SAO los machos residentes fueron más exitosos defendiendo y ganando las cuevas respecto de los intrusos ($\chi^2=8.1$, $p<0.05$). Además, existieron diferencias entre el número de machos que ganó el recurso “hembras” entre áreas de estudio ($\chi^2=8.38$, $p<0.05$, Fig. 2.5b). En LMC, no existieron diferencias entre el tipo de macho que ganó la hembra ($\chi^2=0.1$, $p=0.75$), mientras que en SAO los machos intrusos fueron más exitosos en ganar las hembras respecto de los residentes ($\chi^2=19.6$, $p<0.0001$). El número de machos ganando ambos recursos, cuevas y hembras, fue significativamente mayor en LMC respecto de SAO ($\chi^2=7.71$, $p<0.05$, Fig. 2.5c). Consecuentemente, machos de LMC obtuvieron frecuentemente cuevas y

hembras, mientras que los machos se SAO obtuvieron cuevas o hembras pero raramente ambos recursos.

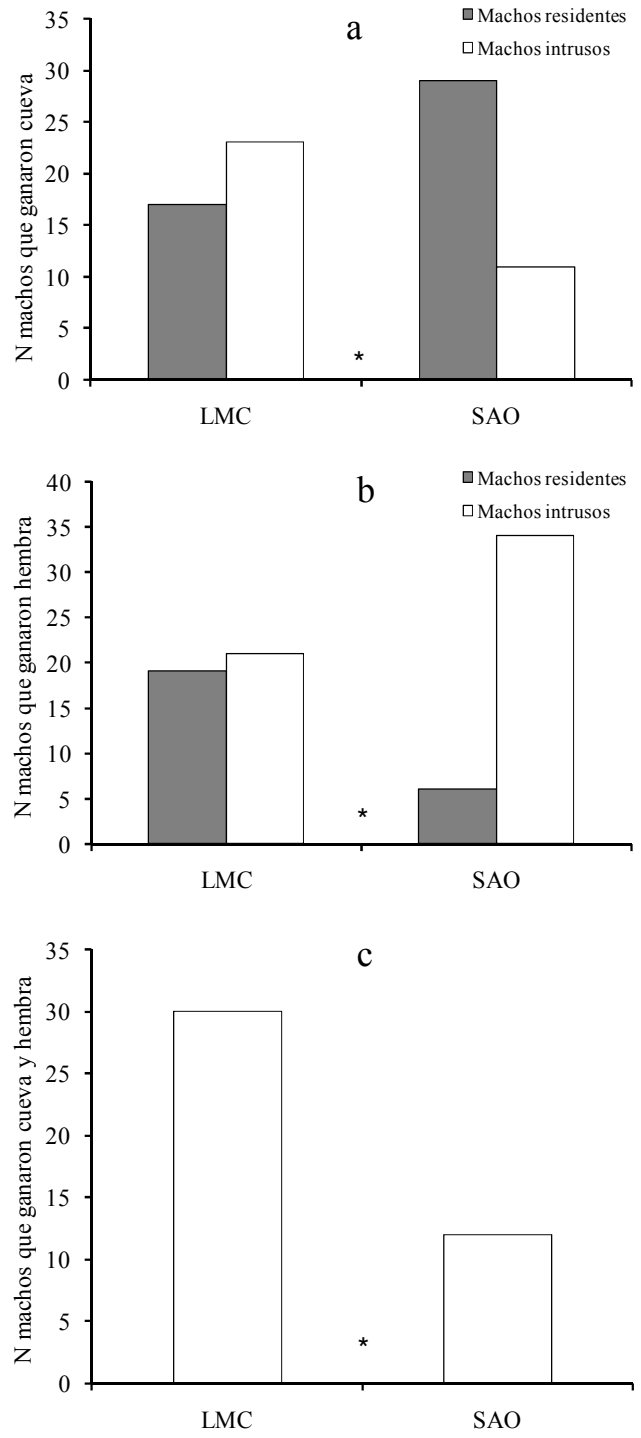


Fig. 2.5. Machos de *Neohelice granulata*. **a.** Comparación entre el número (N) de machos residentes *versus* intrusos que ganaron el recurso cuevas en la Laguna de Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). **b.** Comparación entre el número de machos residentes *versus* intrusos que ganaron el recurso hembras en LMC y SAO. **c.** Comparación entre el número de machos que ganaron ambos recursos, cuevas y hembras, en LMC y SAO. (* $p < 0.05$).

El número y la duración de las interacciones agonísticas ocurridas entre machos residentes *versus* machos intrusos fueron significativamente mayores en los individuos de SAO respecto de los de LMC ($t=4.72$, $p<0.001$, Fig. 2.6a; $t=4.37$, $p<0.001$, Fig. 2.6b; respectivamente).

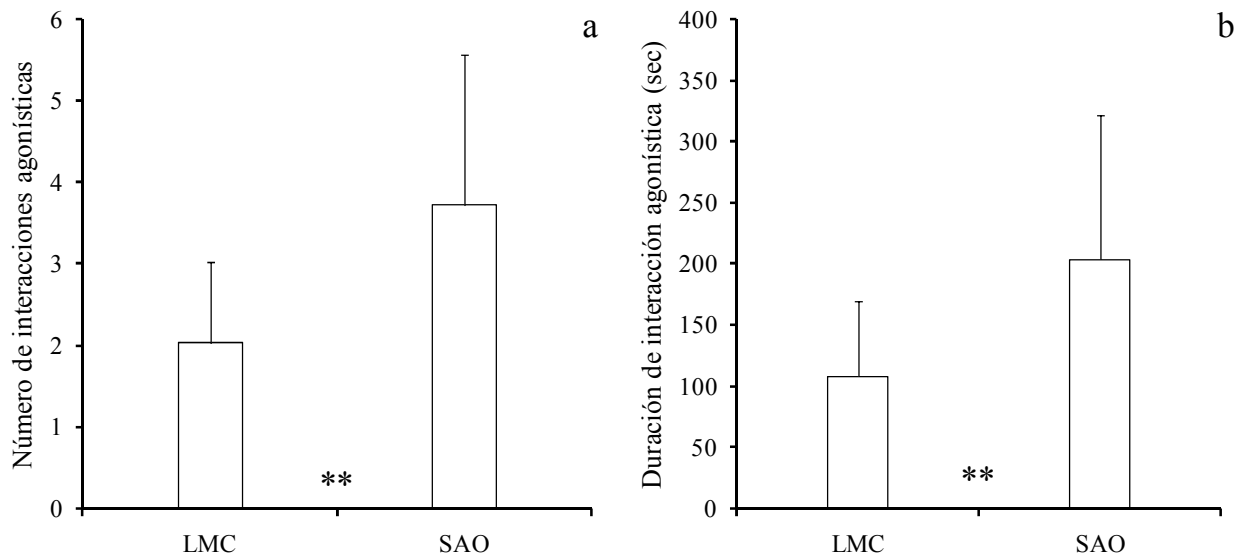


Fig. 2.6. Interacciones agonísticas entre machos de *Neohelice granulata*. Valores medios y desviación estándar del: **a.** Número de interacciones agonísticas entre machos residentes *versus* intrusos de la Laguna de Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO): número de veces que cada para tuvo contacto con sus quelas y se separó. **b.** Tiempo total (seg) que duraron las interacciones agonísticas entre los machos residentes *versus* intrusos en LMC y SAO: tiempo total que cada par invirtió en el encuentro durante todo el experimento. (** $p<0.01$).

Discusión

Las estrategias de apareamiento de las especies dependen del potencial ecológico y comportamental para monopolizar parejas (Emlen y Oring 1977). Los diferentes hábitats y comportamientos requeridos para sobrevivir en los mismos cumplen una función importante en el modelado de los diferentes sistemas de apareamiento (Brockerhoff y McLay 2005b). En el presente capítulo, se estudiaron dos poblaciones de *Neohelice granulata* que habitan ambientes contrastantes, encontrando

diferencias relacionadas con: [1] la forma de las cuevas entre áreas de estudio y entre distintas categorías de cangrejos que las construyeron, [2] el desarrollo de un comportamiento de cuidado post-cópula exitoso, y [3] el comportamiento agonístico entre los machos; indicando que una variedad de estrategias de apareamiento estarían asociadas a distintos tipos de ambientes, por lo cual, parecería que el ambiente puede favorecer o desfavorecer estrategias de apareamiento particulares mediante su efecto sobre la forma de la cueva.

Las diferencias en la forma de la cueva entre áreas de estudio podrían estar relacionadas con la diferente granulometría del sedimento: mientras que sedimentos finos de LMC facilitarían la construcción de cuevas profundas, los sedimentos gruesos –grava– de SAO, por el contrario, la dificultarían. Además, en LMC las cámaras pueden ser construidas a lo largo de la longitud de las cuevas, mientras que en SAO solo son construidas en la entrada de la cueva dada su corta longitud. Este patrón de variación en la forma de la cueva asociado a las características del hábitat tales como la composición del sedimento fue descrito también para otros Grapsoidea como por ejemplo *Austrohelice crassa* (Morrisey et al. 1999; Needham et al. 2010) y *Helograpsus haswellianus* (Katrak et al. 2008). Por otra parte, en estudios realizados en camarones thalassinideos se encontraron cuevas más profundas en hábitats de costas barrosas respecto de las arenosas, indicando que las características del tipo de sedimento modifican la estructura de la cueva (Griffis y Chavez 1988; Li et al. 2008). La diferencia en la longitud de las cuevas de *N. granulata* entre hábitats (espartillar y planicie desnuda) fue caracterizada primeramente por Iribarne et al. (1997), quién además propuso que las diferencias entre hábitats asociadas a la inclinación y tipo de entrada de las cuevas se relacionan con distintos modos tróficos. Posteriormente, Escapa et al. (2007) demostraron que la longitud y el ancho máximo de las cuevas varían entre las planicies con espartillar y los canales de marea, provocando la erosión de las marismas. Si bien, en los estudios mencionados anteriormente se encontraron diferencias en la forma de la cueva respecto de las características del sedimento, en ninguno de ellos se estudió si la forma de las cuevas está asociada al sexo o talla de los constructores y si afecta las estrategias reproductivas y el sistema de apareamiento como se demuestra en el presente capítulo para *N. granulata*.

Las diferencias encontradas en la forma de la cueva entre las distintas categorías de individuos fueron asociadas con la cópula. Así, los MG construyeron cuevas con cámaras o entradas ensanchadas en las cuales ocurrió la cópula con las hembras, mientras que los MC construyeron las mismas cuevas rectas que las hembras en las cuales la cópula no fue observada. Existen pocos estudios en cangrejos grapsóidea que hayan informado que la cópula ocurre dentro de las cuevas, como por ejemplo en *A. crassa* (Brockerhoff y McLay 2005b) y probablemente en *Sesarma reticulatum* (ver Seiple y Salmon 1982), aunque en ningún caso se relacionó la forma de la cueva con el sistema de apareamiento. El caso para los cangrejos ocipódidos es diferente. Por ejemplo, en *Uca annulipes* la arquitectura de la cueva varía entre sexos, siendo las cuevas de los machos de mayor tamaño respecto de las de las hembras, probablemente debido a los mayores requerimientos de espacio de los machos dado su mayor tamaño del cuerpo y de la quela (Lim y Diong 2003), y no asociadas al apareamiento. En *Ocypode ceratophthalma* se encontraron diferencias en la forma de la cueva entre juveniles y adultos, pero no entre sexos, las cuales fueron asociadas al comportamiento respiratorio (ver Chan et al. 2006). Otro es el caso de *Uca pugilator*, en el cual los machos construyen cuevas más profundas con una cámara terminal durante la estación reproductiva, posiblemente con fines para el apareamiento (Christy 1982).

Respecto de *N. granulata*, se encontraron diferencias entre sexos, pero además, diferencias intra-sexuales, dado que tanto los machos chicos como los grandes construyeron cuevas de distinta forma. En base a la hipótesis acerca de que las cuevas son recursos utilizados para el apareamiento, ambos tipos de machos desarrollarían distintas estrategias reproductivas. Es esperable que los machos chicos no inviertan energía en construir cuevas con cámaras porque los machos grandes podrían pelear y ganar esta cueva fácilmente dada su mayor talla. De este modo, se puede proponer que los machos grandes construyen y defienden cuevas con cámaras utilizadas con fines reproductivos, mientras que los machos chicos se aparean con hembras receptivas fuera de las cuevas, que encuentran al azar en la superficie. Se ha establecido que el tipo de hábitat influye sobre las estrategias de los machos maximizando su éxito reproductivo (Brockerhoff y McLay 2005b). En hábitats relativamente estables (donde la forma de la cueva se mantiene por un periodo de tiempo determinado) los machos defienden sus cuevas como sitios de apareamiento durante largos periodos (Seiple y Salmon 1982;

Zimmerman y Felder 1991). La calidad de las cuevas puede ser considerada como un importante criterio en la elección de la pareja por parte de la hembra, dado que la estructura de la cueva influenciaría potencialmente el éxito reproductivo (Christy 1982; Backwell y Passmore 1996). Aunque en el cangrejo violinista *Uca annulipes* no se encontró relación entre la talla del macho y la calidad de la cueva, se sugiere que las hembras utilizarían al menos dos criterios independientes al elegir potenciales parejas: basados en la talla del macho o en las características de sus cuevas (Backwell y Passmore 1996). En este estudio, se observó que la talla de los machos de *N. granulata* (chicos o grandes) se relacionó con la forma de la cueva. Posiblemente, las hembras seleccionen la pareja en base a la combinación de la calidad del recurso (cuevas) y la talla del macho. Las cámaras encontradas en las cuevas podrían constituir un indicador legítimo de la calidad del macho para las hembras, indicando que el macho es capaz de construir una cueva con cámara en la cual puede ocurrir el apareamiento.

En relación a ambas áreas de estudio, en LMC se encontraron diferencias respecto de las cuevas al azar y las construidas en las exclusiones: en las cuevas muestreadas al azar se pudieron encontrar machos chicos en cuevas con cámaras construidas por los machos grandes. Dados los resultados encontrados en el presente capítulo acerca del esfuerzo diferencial invertido en la construcción de cuevas entre áreas de estudio, en LMC el menor esfuerzo registrado, podría explicar la variación observada entre la forma de la cueva y el cangrejo encontrado en su interior, debido a que los machos podrían intercambiar más fácilmente sus cuevas. Por el contrario, en SAO sólo los machos grandes fueron encontrados en cuevas con entradas ensanchadas tanto en cuevas al azar como en cuevas de exclusión. En este caso, esta distribución más precisa en la cual machos chicos y grandes ocupan cuevas construidas por ellos mismos podría ser explicada dado que la construcción de una cueva en este tipo de ambiente insuere un alto costo energético –de acuerdo con los resultados presentados acerca del esfuerzo invertido en la construcción de cuevas entre áreas de estudio– y, consecuentemente, los machos preferían defender sus cuevas una vez que las han construido.

Además, los experimentos de comportamiento muestran que los machos residentes de SAO ganaron cuevas más frecuentemente que hembras. Esto indicaría que los dueños de las cuevas (machos residentes) defenderían sus cuevas, siendo posible que

copulen con una hembra que se acerque e ingrese a ellas, aunque en presencia de un macho intruso, preferían defender su cueva más que la hembra. Puede sugerirse que, habiendo invertido gran cantidad de esfuerzo en la construcción de una cueva, los residentes podrían ser “perdedores” si perdieran su cueva sólo por el cuidado de una hembra, por lo cual, una mejor estrategia a largo plazo consistiría en sobrevivir y esperar futuras oportunidades de apareamiento, sustentando la hipótesis acerca de los altos costos energéticos asociados con la construcción de una cueva en esta área de estudio. Adicionalmente, se puede sugerir que en SAO la función primaria de las cuevas está relacionada con la protección contra la desecación, más que con fines reproductivos, lo cual podría estar asociado con los mayores tiempos de exposición durante marea baja. Por el otro lado, en LMC machos residentes o intrusos ganan alternativamente cuevas o hembras, indicando interacciones más flexibles posiblemente relacionadas con un hábitat menos costoso energéticamente en términos de construcción de una cueva.

El número y la mayor duración de los encuentros agonísticos entre machos de SAO con respecto a los de LMC también indican que la agresividad de las interacciones estaría relacionada con las características ambientales diferenciales de ambas áreas de estudio. Se ha establecido que la intensidad de los enfrentamientos podría variar entre poblaciones de acuerdo a [1] las condiciones determinando el costo o beneficio de ganar el encuentro (como por ejemplo la relación operacional de sexos o la duración del período reproductivo), y [2] el costo físico de involucrarse en un comportamiento agresivo y las oportunidades de ganar el encuentro (dependiendo por ejemplo de las estructuras sexuales secundarias) (Jormalainen et al. 2000). Más aún, la inversión en el comportamiento agresivo debería co-evolucionar con otros caracteres que afectan el resultado del enfrentamiento (Jormalainen et al. 2000). Consecuentemente, el comportamiento agresivo diferencial entre ambas poblaciones de *N. granulata* podría estar dependiendo de las diferentes características de ambas áreas de estudio. De esta manera, la mayor exposición durante la marea baja y el mayor esfuerzo invertido en la construcción de las cuevas en SAO podría estar explicando la mayor agresividad de los machos.

Los comportamientos de cuidado post-copulatorios de la hembra son altamente flexibles y su duración depende del contexto socio-sexual (Sainte-Marie et al. 2008). En

N. granulata el comportamiento de cuidado de la hembra post-cópula estuvo relacionado con la forma de la cueva, y consecuentemente, con el área de estudio. En LMC, la existencia de una cámara cerrada en el interior de la cueva favorecería que los machos cuiden y sean exitosos en retener a las hembras en su interior, mientras que en SAO, la existencia de una cámara abierta, a modo de una entrada ensanchada, podría estar relacionada con el desarrollo de un comportamiento de cuidado post-cópula menos exitoso. La alta proporción de machos (residentes o intrusos) en LMC ganando ambos recursos, cuevas y hembras, también indicaría que la presencia de una cámara cerrada favorecería la defensa de la hembra, por lo tanto, el desarrollo de un comportamiento de cuidado post-copulatorio exitoso. Brockerhoff y McLay (2005b) encontraron que en los graposideos *Hemigrapsus crenulatus* y *H. sexdentatus*, el cuidado post-copulatorio prolongado es una estrategia esperada que aumenta las probabilidades de fecundación de los machos. El desarrollo de un cuidado post-copulatorio de la pareja le permitiría al macho asegurarse la paternidad de la progenie, dado que prevendría a machos rivales de inseminar a la hembra, por lo tanto, reduciría el riesgo de competencia espermática dentro del receptáculo seminal (Parker 1970; Smith 1984). López Greco et al. (1999) describió que *N. granulata* presenta un receptáculo seminal del tipo “ventral” definido por Diesel (1991). Consecuentemente, en *N. granulata*, las diferencias en el desarrollo de un comportamiento de cuidado de la hembra post-copulatorio entre poblaciones tendría importantes implicancias en el sistema de apareamiento: en LMC, los machos serían más exitosos en asegurarse la paternidad de la descendencia con respecto a los machos de SAO.

Diferentes poblaciones de la misma especie podrían presentar distintos sistemas de apareamiento, siempre que los individuos de cada población estén experimentando condiciones ecológicas distintas. Sin embargo, el cambio de un sistema de apareamiento a otro no sólo dependería de las condiciones del ambiente, sino también de cuán flexible sean las especies en términos de comportamiento, fisiología o atributos morfológicos (Baeza y Thiel 2007). Como conclusión, se propone que en *N. granulata* las cuevas construidas por los machos grandes constituyen sitios utilizados para el apareamiento, que el desarrollo de un comportamiento de cuidado de la hembra post-copulatorio y consecuentemente la paternidad de la progenie, dependen de la forma de la cueva asociada con el área de estudio y la talla del macho. La intensidad de los encuentros

agonísticos y la preferencia de los machos por ganar recursos como las cuevas, hembras o ambos, también depende de las características del ambiente. Por lo tanto, los machos desarrollarían diferentes estrategias de apareamiento de acuerdo con el tipo de hábitat para asegurar el éxito reproductivo.



Capítulo III

**Receptividad de hembras de *Neohelice granulata*:
diferentes estrategias que maximizan su éxito
reproductivo**

El presente capítulo está publicado en: Sal Moyano MP; Luppi T, Gavio MA, Vallina M, McLay C. 2012. Receptivity of female *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae): different strategies to maximize their reproductive success in contrasting habitats. *Helgoland Marine Research*. 159: 1403–1416. DOI 10.1007/s10152-012-0299-y

Receptividad de hembras de *Neohelice granulata*: diferentes estrategias que maximizan su éxito reproductivo

Introducción

Los sistemas de apareamiento dependen de determinadas condiciones ecológicas tales como la abundancia y distribución de los recursos y de hembras receptivas, en espacio y tiempo, los cuales determinan el potencial para el desarrollo de la poligamia (Emlen y Oring 1977; Shuster y Wade 2003). Emlen y Oring (1977) consideraron a la distribución espacial y temporal de hembras receptivas como un elemento importante que modela los sistemas de apareamiento. Adicionalmente, los sistemas de apareamiento son el resultado de estrategias reproductivas complejas empleadas por hembras y machos. En el modelado de los sistemas de apareamiento de crustáceos, las decisiones de las hembras deberían tener la misma importancia que las de los machos (Brockerhoff y McLay 2005b). Se han realizado gran cantidad de estudios con el fin de clarificar las estrategias de apareamiento desarrolladas por los machos para asegurar su éxito reproductivo (e. j. Goshima et al. 1996; Jivoff 1997a; Rondeau y Sainte-Marie 2001; Sato et al. 2006), aunque son pocos los que se han focalizado en las estrategias empleadas por las hembras (e. j. Brockerhoff y McLay 2005a; Sainte-Marie et al. 2008; Sato y Goshima 2007).

Existen dos mecanismos diferentes por medio de los cuales las hembras optimizan su éxito reproductivo. Por un lado, el aumento de su *fitness* lo lograrían al aparearse con gran cantidad de machos, incrementando la diversidad genética de su descendencia (Andersson 1994; Jennions y Petrie 2000), mientras que por otro lado, estudios más recientes establecen que las hembras y su progenie se beneficiarían siendo monógamas, eligiendo un único macho de “buenos genes” (Hunt et al. 2004; Jennions et al. 2007). Además, específicamente la estrategia de las hembras braquiura debería consistir en maximizar la probabilidad de la fecundación de los ovocitos mediante el mantenimiento del esperma viable y del mantenimiento del receptáculo seminal lo más lleno posible (McLay y López Greco 2011). En el caso de los machos, su éxito reproductivo sería maximizado al aparearse con la mayor cantidad de hembras posibles

(Trivers 1972; Clutton-Brock y Parker 1992). Además, específicamente el objetivo de los machos braquiura consistiría en que su esperma ocupe la mayor parte del receptáculo seminal de la hembra y que se ubique en una posición en la cual se favorezcan las chances de fecundación de los ovocitos (McLay y López Greco 2011). Dependiendo de la estructura del receptáculo seminal, puede ser mejor ser el primero o el último en copular a la hembra (McLay y López Greco 2011, ver detalle en capítulo I). Además, el tiempo y la duración de la receptividad de las hembras tendrían un impacto sobre las estrategias reproductivas desarrolladas por los machos dado que estos deberían elegir entre invertir tiempo cuidando una hembra receptiva o buscar otras hembras receptivas con el objetivo de aumentar sus probabilidades de éxito reproductivo (Parker 1970).

La duración de la receptividad de las hembras depende de factores externos como la temperatura y/o el ciclo lunar (Zimmerman y Felder 1991; Caubet et al. 1998; Flores y Negreiros-Fransozo 1998; Henmi y Murai 1999), o de factores internos como el desarrollo de los ovarios y el período de muda (DeKleijn 1998). Además, existe evidencia acerca de que algunas hembras de crustáceos pueden controlar su receptividad (Brockerhoff y McLay 2005a; Cowan y Atema 1990; Thiel y Hinojosa 2003). Respecto de los factores internos, se destaca el estado reproductivo de las hembras, incluyendo el grado de desarrollo de los ovarios y las características del receptáculo seminal. Cuando el esperma proveniente de distintos machos es acumulado, el receptáculo seminal es el sitio en el cual debería ocurrir una eventual competencia espermática (Orensanz et al. 1995; Sainte-Marie 2007). Atributos morfológicos del receptáculo seminal favorecen la ruptura de los espermátóforos y el mantenimiento del esperma viable (Anilkumar et al. 1996, 1999), por lo cual, estarían involucrados en la competencia espermática.

Adicionalmente, la forma de la vulva es otro factor interno que tiene importantes implicancias en el tipo de apareamiento y en la duración del período receptivo. En las hembras de los Brachyura existen tres tipos de forma de cerramiento de la vulva: [1] por simple acción muscular, [2] mediante un opérculo siempre móvil, y [3] mediante un opérculo fijo, sólo móvil durante determinados períodos, cuando la hembra se encuentra receptiva (Hartnoll 1968, 2006; Thompson y McLay 2005). La capacidad del opérculo de volverse móvil es frecuentemente atribuida a un proceso de descalcificación que ocurre con anterioridad al apareamiento (Hartnoll 1969; Henmi y Murai 1999), aunque esto no ha sido nunca demostrado experimentalmente.

De esta forma, los factores que afectan el tiempo y duración del periodo de receptividad de las hembras, incluyendo la morfología de la vulva y el estado reproductivo, son elementos importantes que se utilizan para interpretar el comportamiento de apareamiento y las estrategias que emplean las hembras para maximizar su éxito reproductivo.

Existen dos tipos de apareamiento en los Brachyura relacionados con la forma de la vulva, el tiempo y la duración de la receptividad de las hembras, y el periodo de muda: cuando el apareamiento ocurre [1] en post-muda (las hembras se encuentran morfológicamente capaces de copular), o [2] en inter-muda (el opérculo de la vulva de las hembras se vuelve temporalmente móvil) (McLay y López Greco 2011, descriptos en detalle en el capítulo I). El tiempo y la duración de la receptividad de las hembras son importantes dado que determinan la relación operacional de sexos (ROS, definida en el capítulo I). En algunas especies de crustáceos, muchas hembras se vuelven receptivas sincrónicamente, reduciendo la oportunidad de los machos de copular con múltiples hembras (Sastry 1983). Por el contrario, hembras de otras especies se vuelven receptivas asincrónicamente resultando en una ROS desviada a favor de los macho, promoviendo una fuerte competencia entre los machos por obtener una pareja y aumentando el potencial de la selección sexual (Orensanz et al. 1995; Correa y Thiel 2003).

Estudios previos realizados en *Neohelice granulata* compararon la población ubicada en la bahía de San Antonio Oeste (SAO), y en el estuario de la Laguna de Mar Chiquita (LMC), en los cuales las diferencias entre la estructura de la población (Bas et al. 2005), la biología reproductiva (Ituarte et al. 2006), el número, talla y composición de los huevos y el desarrollo embrionario (Bas et al. 2007, 2008) estuvieron relacionadas con el tipo de hábitat y las condiciones del ambiente. Estos estudios demostraron que la estación reproductiva es más larga en LMC respecto de SAO, extendida desde septiembre hasta febrero y desde noviembre hasta enero, respectivamente, aunque las diferencias entre poblaciones respecto de los rasgos reproductivos no estuvieron asociadas a un gradiente de temperatura latitudinal, sino a la cantidad y calidad del alimento diferencial entre áreas de estudio (Bas et al. 2007; Ituarte et al. 2006). Durante la estación reproductiva, los individuos de *N. granulata* pueden desovar varias veces (Ituarte et al. 2004, 2006), aunque la duración del período receptivo no fue estudiada con anterioridad al presente capítulo. Es esperable que las

hembras de ambas poblaciones desarrollen diferentes estrategias reproductivas respecto del período receptivo asociado al tipo de hábitat.

Hipótesis

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se plantea como hipótesis general del presente capítulo que las hembras receptivas de *N. granulata* presentan un opérculo móvil el cual se descalcificará durante un período de tiempo determinado. Como hipótesis derivadas se establece que:

- [1] la forma de la vulva varía entre hembras receptivas y no receptivas,
- [2] los niveles de calcio de la vulva en hembras receptivas son más bajos respecto de las hembras no receptivas,
- [3] la anatomía del receptáculo seminal varía entre hembras receptivas y no receptivas,
- [4] la duración del período receptivo varía entre poblaciones, y
- [5] el mecanismo de ruptura de los espermátóforos está asociado con la condición receptiva de las hembras.

Objetivos

En este contexto, el objetivo general del presente capítulo fue estudiar la receptividad de hembras *N. granulata* y las estrategias asociadas a dicho proceso. Como objetivos específicos se planteó:

- [1] caracterizar la morfología de la vulva de hembras receptivas y no receptivas mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB),
- [2] determinar si existen diferencias en los niveles de calcio u otros elementos de la vulva entre hembras receptivas y no receptivas mediante el uso de la técnica EDAX-MEB,
- [3] estudiar la anatomía del receptáculo seminal de hembras receptivos y no receptivas mediante el uso de técnicas histológicas,
- [4] determinar la duración de la receptividad de las hembras y evaluar diversos factores que puedan influenciarla como la talla de las hembras, la presencia de machos o el peso del contenido del receptáculo seminal; en las dos poblaciones, LMC y SAO, y;
- [5] evaluar diferentes mecanismos involucrados en la ruptura de los espermátóforos.

Materiales y métodos

Obtención y mantenimiento de individuos

Los muestreos se realizaron durante las estaciones reproductivas de 2008/2009, 2009/2010 y 2010/2011 en LMC y 2009/2010 y 2010/2011 en SAO. Los cangrejos fueron medidos con calibre y se consideró al ancho del caparazón (AC) como la variable de referencia. Los cangrejos maduros (>19 mm AC, López Greco y Rodríguez 1998) fueron transportados al laboratorio y colocados en acuarios individuales con agua de mar (0.3x0.35x0.25 m, 3 cm de agua), aireados permanentemente, mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperiodo y la temperatura fue controlada, variando de 23°C a 27°C (media 24.5°C). Los individuos fueron alimentados diariamente con alimento balanceado y el agua fue cambiada semanalmente. El período receptivo de las hembras fue monitoreado en laboratorio mediante el chequeo de la movilidad del opérculo: el pleon fue separado del tórax y ambos opérculos fueron diariamente controlados utilizando agujas, bajo lupa estereoscópica. Cuando el opérculo se encontró móvil, este pudo ser desplazado y las hembras se consideraron receptivas (Brockhoff y McLay 2005c). La duración de la receptividad de las hembras fue considerada desde el primer día que se encontró el opérculo móvil hasta que este se volvió inmóvil nuevamente (durante el periodo de movilidad del opérculo, las hembras pudieron copular con los machos y desovar, o ocurrió cópula y el opérculo se volvió a inmovilizar sin desove).

Morfología de la vulva

Para la descripción de la vulva, se utilizaron 14 hembras receptivas (22.9-29.7 mm AC) y nueve hembras no receptivas (20.3-31.2 mm AC) las cuales fueron sacrificadas en freezer a -15°C por aproximadamente 30 min y diseccionadas, obteniéndose el área rodeando a la vulva. Las muestras fueron fijadas en 2.5% glutaraldehído y acondicionadas en buffer 0.1 M de cacodilato de sodio a pH 7.2-7.4. Posteriormente fueron deshidratadas en una serie graduada de alcoholes y secadas con hexametildisilazano remplazando en punto crítico, metalizadas en oro-paladio y observadas en microscopio JEOL 6460.

Niveles de calcio en la vulva

Para determinar si existen diferencias en los niveles de calcio u otros elementos entre la vulva de hembras receptivas y no receptivas, se utilizaron 12 hembras no receptivas (18.5-26.8 mm AC) y 11 hembras receptivas (19.6-27.2 mm AC). Ambos tipos de hembras fueron sacrificadas en freezer a -15°C por aproximadamente 30 min y diseccionadas, obteniéndose el área rodeando la vulva. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente (23°C – 25°C), metalizadas en oro-paladio y observadas en microscopio JEOL 6460. Se diferenciaron tres áreas en la vulva: el opérculo, la membrana (ver resultados) y el exoesqueleto adyacente; las cuales fueron examinadas utilizando la técnica EDAX-MEB. El objetivo de esta técnica consiste en determinar la composición química de las estructuras observadas y analizadas al MEB. Se realizó un ANOVA para detectar diferencias en el peso atómico del calcio entre las tres áreas estudiadas (opérculo, membrana y exoesqueleto adyacente) para hembras receptivas y no receptivas. En caso de detectarse diferencias se realizó un test de Tukey posterior para reconocer las áreas que diferían entre sí.

Morfología del receptáculo seminal

Para los estudios histológicos, de las hembras que se colectaron del campo y se acondicionaron en laboratorio, se distinguieron dos grupos: 26 hembras receptivas que desovaron (23.4-28.3 mm AC) y 20 hembras no receptivas, inmaduras o hembras que recientemente se habían vuelto no receptivas sin desovar (16.7-29.4 mm AC). Ambos grupos de hembras fueron sacrificadas en freezer a -15°C por aproximadamente 30 min. Se diseccionaron los receptáculos seminales derecho e izquierdo. El estado de madurez del ovario se clasificó de acuerdo a su morfología y color. Se consideraron ovarios maduros aquellos que se encontraron cubriendo todo el hepatopáncreas y presentaron una consistencia granular y color violeta (estadio 5, Ituarte et al. 2004). Las muestras de tejido se fijaron en solución de Bouin durante 24 hs, se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes, se colocaron en xileno y se embebieron en parafina. Las muestras fueron cortadas en secciones seriadas (5-7 μm) con micrótomo Minot, montadas en porta objetos y teñidas con hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson para su observación bajo microscopio de luz.

Duración de la receptividad: factores involucrados

Se determinó la receptividad de las hembras de LMC (20.2-30.6 mm AC) y SAO (21.4-28.2 mm AC) en condiciones de laboratorio. Los cangrejos se colectaron del campo un mes antes del comienzo de la estación reproductiva en cada área de estudio, se transportaron al laboratorio y se acondicionaron en dos tratamientos:

[1] cuatro hembras,

[2] tres hembras y un macho.

Cuando una hembra se encontró receptiva fue marcada con una marca circular en el caparazón realizada con esmalte de color, y examinada diariamente hasta que la misma se volvió no receptiva. Se registró si la hembra desovó o no. Se realizaron dos tipos de estudios, uno de corto y otro de largo plazo. En los estudios de corto plazo, la duración de la receptividad fue relacionada con cuatro variables: [1] si las hembras desovaron o no ($N_{LMC}=123$, $N_{SAO}=78$), [2] la talla de las hembras ($N_{LMC}=101$, $N_{SAO}=65$), [3] la presencia de machos ($N_{LMC}=118$, $N_{SAO}=68$), y [4] el contenido del receptáculo seminal: inmediatamente que la hembra se volvió no receptiva en su primer período receptivo de la estación reproductiva, las hembras fueron sacrificadas en freezer a -15°C por aproximadamente 30 min. Los receptáculos seminales derecho e izquierdo fueron diseccionados y pesados, y se calculó un promedio de ambos pesos ($N_{LMC}=63$, $N_{SAO}=47$). En los estudios a largo plazo, se colectaron 16 hembras de LMC y 17 hembras de SAO un mes antes del comienzo de la estación reproductiva (agosto en LMC y octubre en SAO), las cuales fueron mantenidas en condiciones de laboratorio durante toda la estación reproductiva, septiembre-febrero y noviembre-enero, respectivamente, en los dos tratamientos descritos anteriormente. Se registró el número de veces que cada hembra estuvo receptiva.

La normalidad y homogeneidad de varianzas se evaluó antes de realizar tests paramétricos. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad u homogeneidad de varianzas, se aplicó a los datos transformaciones logarítmicas o se realizaron tests no paramétricos. En los estudios a corto plazo, se realizó un ANOVA de dos vías para testear diferencias en la duración de la receptividad en relación con el status reproductivo de las hembras (hembras que desovaron y hembras que no desovaron) y las dos áreas de estudio. Para testear si la duración de la receptividad estuvo relacionada con el tipo de hembra (de receptividad corta o extendida, ver

Resultados), el área de estudio, y la talla de las hembras o el peso del receptáculo seminal, se realizaron dos ANCOVAs de dos vías, respectivamente. Para testear si la duración de la receptividad estuvo relacionada con la presencia de machos, el tipo de hembra y el área de estudio, se realizó un ANOVA de tres vías. Para testear diferencias en el peso del receptáculo seminal en relación con el tipo de hembra y el área de estudio, se realizó un ANOVA de dos vías. Se compararon las diferencias entre las proporciones de hembras que desovaron o no entre áreas de estudio utilizando un test de Chi-cuadrado: cuando se encontraron diferencias en cada área, las frecuencias observadas y esperadas fueron comparadas. Para las hembras de LMC, se testeó si existieron diferencias en la duración de la receptividad entre los meses de septiembre a febrero de las estaciones reproductivas 2008/2009, 2009/2010 y 2010/2011, utilizando un test de Kruskal-Wallis. Para identificar los meses que difirieron entre sí, se realizó un test de Student-Newman-Keuls. En los estudios a largo plazo, dado que un pequeño número de hembras pudieron ser mantenidas durante la estación reproductiva completa, el número de veces que las hembras estuvieron receptivas en ambos tratamientos fueron considerados juntos y comparados entre áreas utilizando un test-t. Debe ser explicitado que algunas hembras se encontraron en el mismo acuario durante todo el experimento, por lo cual, estos datos no fueron independientes y podrían afectar el comportamiento (Cowan y Atema 1990). Los resultados fueron reportados como la media \pm desvío estándar.

Experimentos de ruptura de espermatozoides

Un mes antes del comienzo de la estación reproductiva se colectaron de la LMC ejemplares de machos y hembras, los cuales fueron acondicionados en laboratorio. Se sacrificaron diez hembras receptivas (23.3-30.5 mm AC), 10 hembras no receptivas (24.9-32.3 mm AC) y 20 machos (25.4-33.1 mm AC) en freezer a -15°C por aproximadamente 30 min. El receptáculo seminal (RS) y el ovario de las hembras, y los vasos deferentes de los machos, fueron diseccionados y pesados. Se utilizó un peso medio arbitrario de las muestras de tejido de 0.04 ± 0.0056 g. Los ovarios y vasos deferentes fueron cortados en secciones con el objetivo de obtener ovocitos y espermatozoides (EPF) libres, mientras que un squash del RS fue obtenido. Las hembras de *N. granulata* acumulan esperma y/o EPF en su RS, aunque la presencia de espermatozoides es observada sólo hasta 24 hs posteriores a la cópula. Luego, los EPF

son rotos y sólo se observan espermatozoides libres. En el RS de las hembras utilizadas para el presente experimento es improbable que se encuentren EPF dado que las mismas fueron colectadas del campo con anterioridad al comienzo de la estación reproductiva y mantenidas aisladas de machos. Los EPF de *N. granulata* fueron reconocidos como paquetes discretos, de forma elipsoidal, limitados por una delgada membrana y conteniendo los espermatozoides. Los experimentos para determinar los posibles mecanismos involucrados en la ruptura de los EPF se diseñaron considerando 5 tratamientos:

- [1] EPF solos a modo de control,
- [2] incubación de EPF + el RS de una hembra receptiva,
- [3] incubación de EPF + el RS de una hembra no receptiva,
- [4] incubación de EPF + ovocitos de una hembra receptiva, y
- [5] incubación de EPF + ovocitos de una hembra no receptiva.

Todos los tratamientos se realizaron en un vaso de precipitado de vidrio de 5 ml conteniendo 80% de agua de mar filtrada, y se mezclaron durante 10 min. Se obtuvo una muestra de 0.2 ml con una pipeta, la cual fue montada en un portaobjetos, teñida con azul de metileno y observada bajo microscopio de luz. Los portaobjetos fueron divididos previamente en cuadrantes de tamaño similar con el fin de facilitar el conteo de EPF. Se contó y se sumó el número de EPF por cuadrante para cada tratamiento. Estos valores fueron comparados entre tratamientos utilizando un test de Kruskal-Wallis dado que los datos no presentaron normalidad ni homogeneidad de varianzas. Luego de un test de Kruskal-Wallis significativo, se realizó un test de Student-Newman-Keuls con el fin de identificar los tratamientos que difirieron entre sí. Se obtuvieron 10 réplicas por tratamiento. La metodología fue diseñada de acuerdo con Sarker et al. (2009).

Resultados

Morfología de la vulva

La vulva de las hembras, tanto de las receptivas como las de las no receptivas consiste en dos porciones: un opérculo y una membrana (Fig. 3.1a). El opérculo se observa como una protuberancia, que presenta una forma cóncava hacia el lado de la

membrana de modo de permitir la inserción del gonopodo durante la cópula (Fig. 3.1a, d). Sobre el opérculo, se observa la presencia de escasas setas aisladas de forma cónica e inserción infracuticular (Fig. 3.1b). Estas setas pueden estar cubiertas y rodeadas por secreción (Fig. 3.1c). Se encontraron diferencias entre la membrana de hembras receptoras y no receptoras. En las no receptoras, la membrana se presentó como una superficie lisa (Fig. 3.1a). En hembras receptoras, la membrana se presentó como una superficie arrugada, la cual permitió la movilidad y el desplazamiento del opérculo hacia atrás durante la inserción del gonopodo en la cópula (Fig. 3.1d).

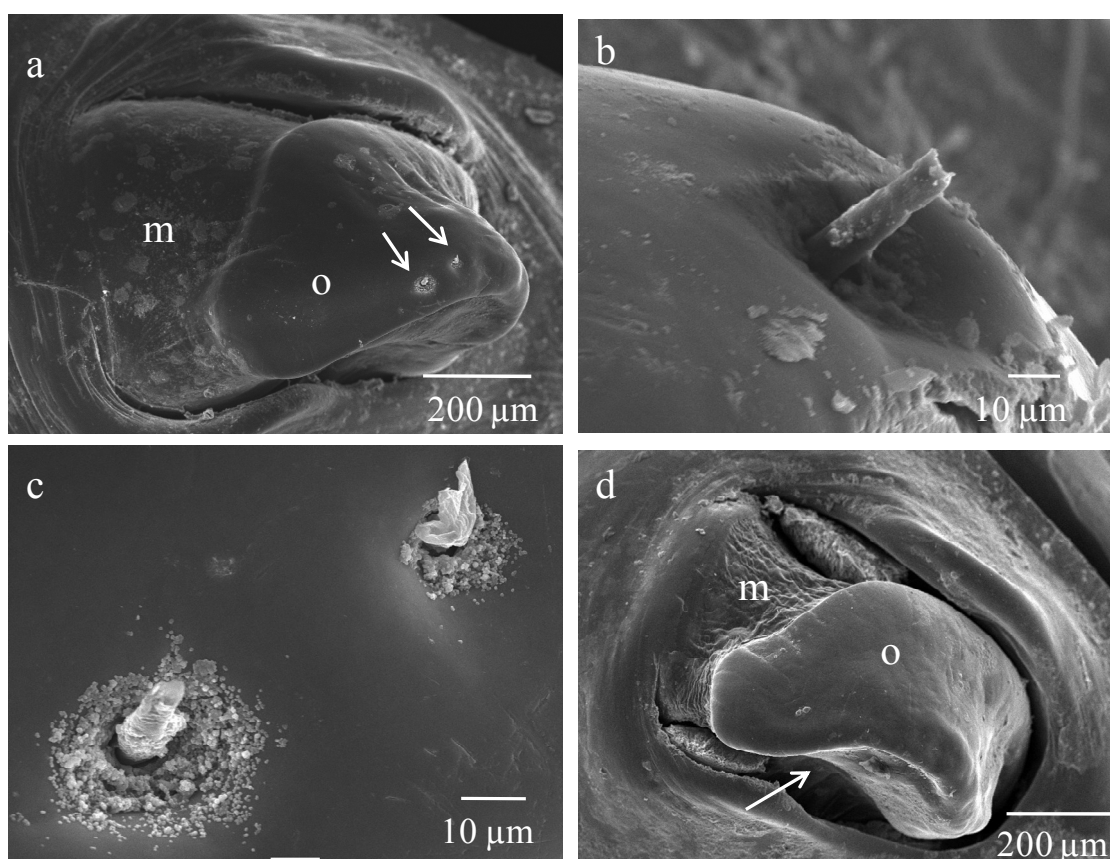


Fig. 3.1. Vulva de las hembras de *Neohelice granulata*. **a.** Hembras no receptoras caracterizadas por la presencia de un opérculo (o) inmóvil y una membrana cuya superficie se observa lisa (m). Se encontraron setas en la punta del opérculo (flechas). **b.** Vista detallada de setas simples cónicas con inserción infracuticular. La punta de la seta en la figura ha sido rota. **c.** Vista detallada de dos setas simples cónicas cubiertas y rodeadas por secreciones. **d.** Hembra receptiva con opérculo móvil. Se encontró el opérculo (o) y una membrana cuya superficie se observa arrugada (m) permitiendo la movilidad del opérculo, dado que el mismo puede ser desplazado hacia atrás por el gonopodo del macho durante la cópula (representado por la flecha).

Niveles de calcio en la vulva

Entre hembras receptivas y no receptivas, se encontraron diferencias sólo en los niveles de calcio y no de otros elementos medidos tales como fósforo, silicio, aluminio, sodio, magnesio, hierro, potasio y cloro. En hembras no receptivas (ANOVA, $F=17.66$, $p<0.0001$), el peso atómico del calcio fue alto en la membrana (8.44 ± 3.9) y el exoesqueleto adyacente (11.32 ± 2.93), pero bajo en el opérculo (4.82 ± 0.65) (Fig. 3.2a, b, c). El Test de Tukey posterior mostró diferencias entre el peso atómico del calcio entre el opérculo y la membrana ($p<0.01$), el opérculo y el exoesqueleto adyacente ($p<0.01$), mientras que no se encontraron diferencias entre la membrana y el exoesqueleto adyacente. En hembras receptivas (ANOVA, $F=120.34$, $p<0.0001$), el peso atómico del calcio fue bajo en el opérculo (2.75 ± 1.03), y en la membrana (0.76 ± 0.49), y alto en el exoesqueleto adyacente (10.61 ± 2.50) (Fig. 3.2d, e, f). El Test de Tukey posterior mostró diferencias entre el peso atómico del calcio entre el opérculo y la membrana ($p<0.05$), el opérculo y el exoesqueleto adyacente ($p<0.01$), y entre la membrana y el exoesqueleto adyacente ($p<0.01$).

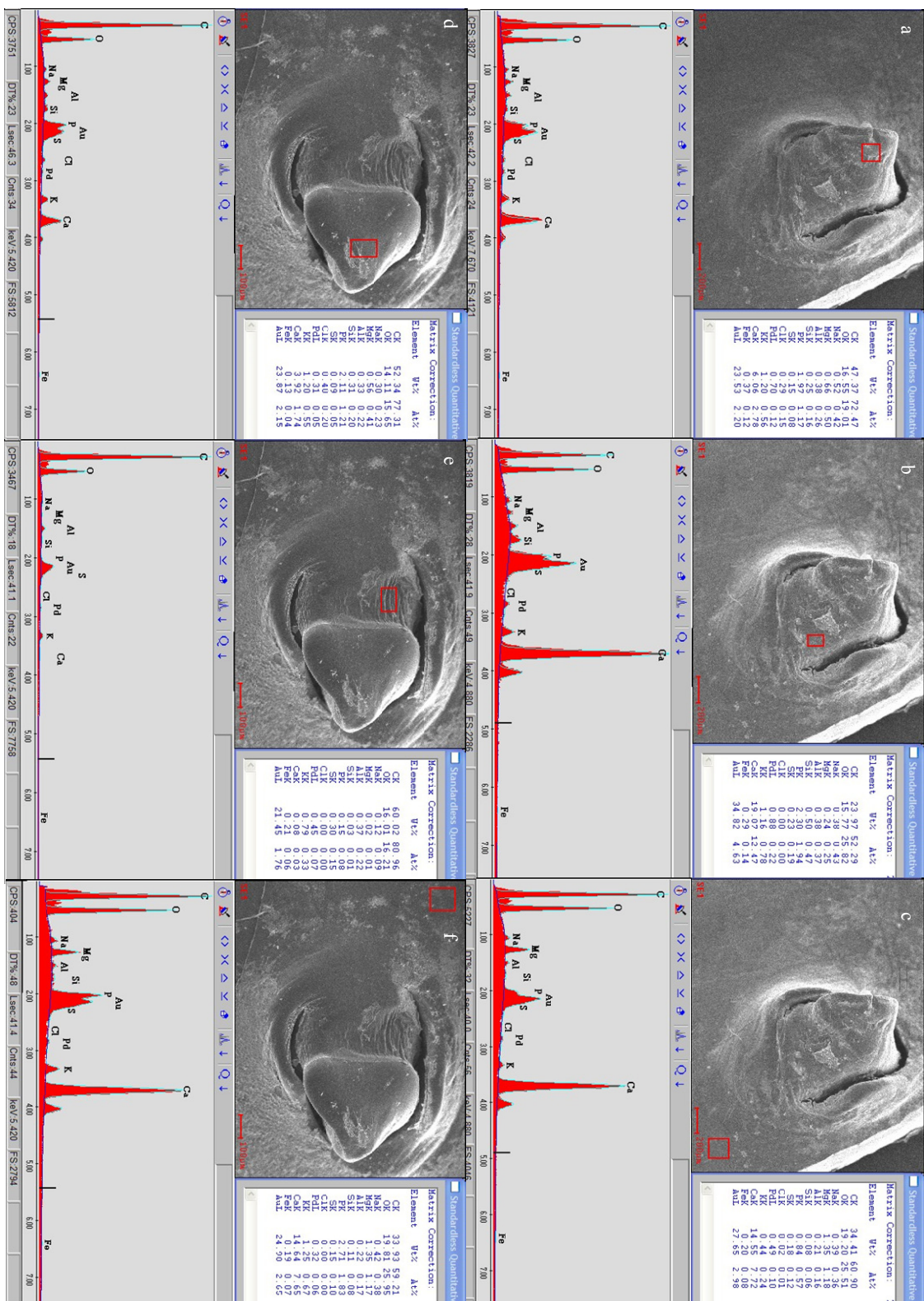


Fig. 3.2. Niveles de calcio y otros elementos en vulva de hembras de *Neohelice granulata*. Hembra no receptiva: **a, b, c**. Hembra receptiva: **d, e, f**. En cada panel se muestran: la foto de la vulva y el lugar en el cual se realizó la medición de los niveles de calcio y de los demás elementos (cuadrados rojos): opérculo (**a, d**), membrana (**b, e**) y exoesqueleto adyacente (**c, f**); el nivel de calcio y de los demás elementos encontrados expresados en términos de peso atómico (Wt%) y porcentaje atómico (At%) y el perfil de los niveles de calcio y otros elementos encontrados.

Morfología del receptáculo seminal

Macroscópicamente, el receptáculo seminal tiene una forma redondeada y es del tipo ventral dado que el oviducto, a modo de tubo corto, se conecta con la parte ventral del receptáculo seminal, cerca de la vagina. En las secciones histológicas, el receptáculo seminal muestra la presencia de dos cámaras, dorsal y ventral, rodeadas de capas de tejido conectivo y muscular (Fig. 3.3a). Se observa la transición entre dos tipos de tejido diferentes, aunque una constricción a modo de “velo” separando ambas cámaras no se reconoce (Fig. 3.3a). La cámara dorsal presenta un epitelio multiestratificado de células secretoras, cuyo grosor se modifica de acuerdo al estado de receptividad de las hembras. En hembras receptivas, el epitelio presenta una o dos capas de células secretoras (Fig. 3.3b), mientras que en las no receptivas es multiestratificado mostrando una gran actividad de las células secretoras dado que las mismas se encuentran formando vesículas de secreción (Fig. 3.3c). La cámara ventral presenta un epitelio simple de células columnares, el cual se encuentra plegado en hembras vírgenes (Fig. 3.3d), mientras que se observa estirado en las no vírgenes, lo cual indicaría la capacidad de estiramiento de esta cámara. Dicho epitelio de la cámara ventral se encuentra recubierto internamente por cutícula (Fig. 3.3e). En hembras inmaduras o en aquellas maduras que se habían vuelto no receptivas recientemente sin desovar, se observa la presencia de un tejido particular, caracterizado por poseer una gran cantidad de células densamente empaquetadas, en la unión del oviducto con la cámara ventral del receptáculo seminal (Fig. 3.3f, g, h). En hembras receptivas que desovaron, este tejido particular está ausente y el oviducto se conecta directamente con la cámara ventral del receptáculo seminal. El oviducto está caracterizado por la presencia de un epitelio simple de células planas (Fig. 3.3h). Todas las hembras receptivas diseccionadas presentaron ovarios en su último estadio de madurez, caracterizados por su consistencia granular y color violeta, mientras que todas las hembras receptivas que desovaron presentaron ovarios post-evacuados caracterizados por su color transparente.

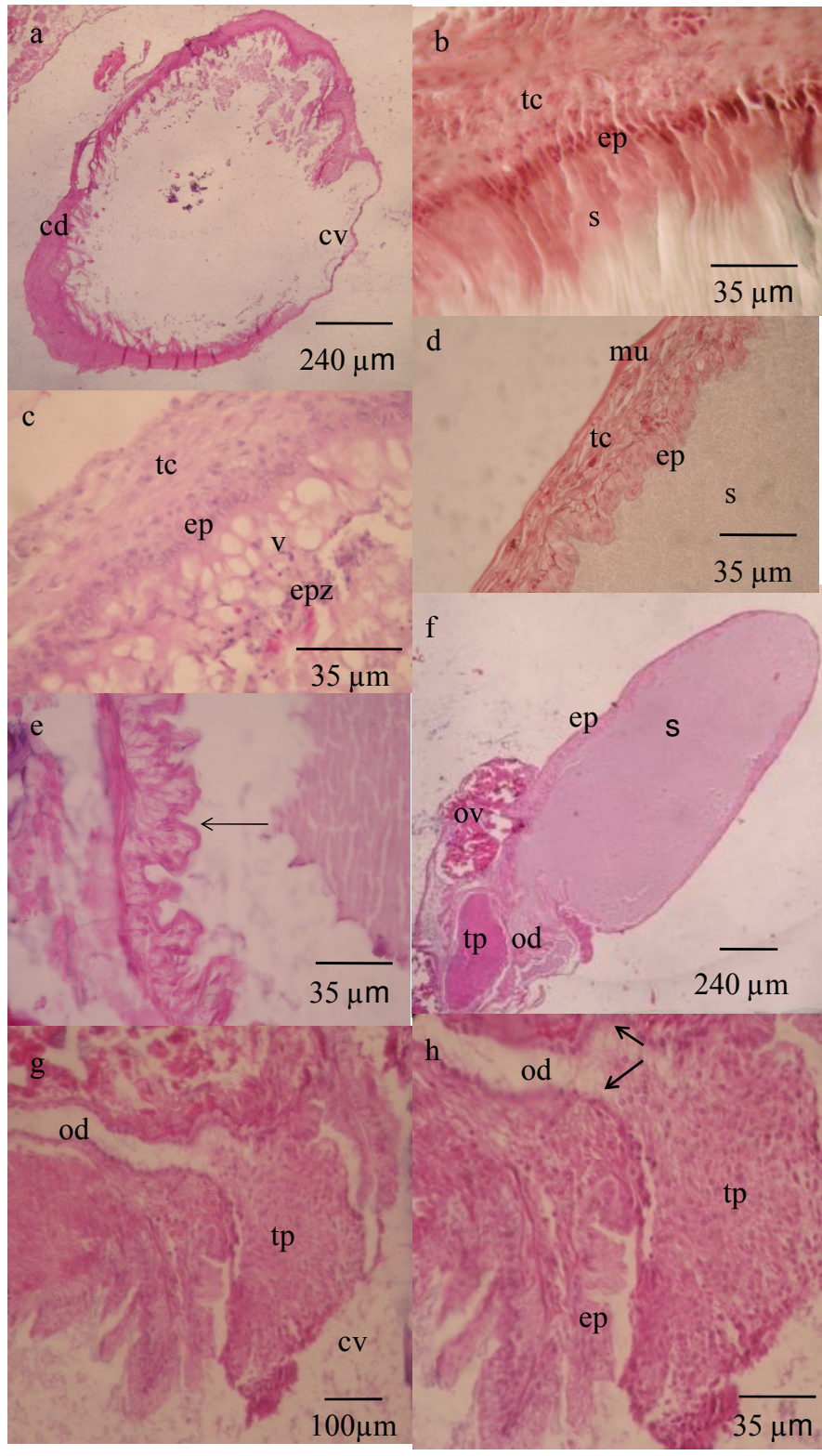


Fig. 3.3. Receptáculo seminal de hembras de *Neohelice granulata*. **a.** Vista general de la cámara dorsal (cd) con un epitelio secretor y la cámara ventral (cv) con un epitelio simple. **b.** Hembra receptiva, el epitelio multiestratificado (ep) de la cámara dorsal presenta una o dos capas de células secretoras las cuales se encuentran produciendo secreciones (s), rodeadas por una capa de tejido conectivo (tc). **c.** Hembras no receptivas, el epitelio (ep) presenta múltiples capas de células secretoras cuyas secreciones se encuentran formando vesículas (v), rodeadas por una capa de tejido conectivo (tc). Se encontraron espermatozoides (epz) rodeados de secreciones. **d.** Cámara ventral del receptáculo seminal de una hembra inmadura. Vista detallada del epitelio ventral plegado de células columnares (ep) rodeado por capas de tejido conectivo (tc) y muscular (mu) rodeando las secreciones del receptáculo seminal (s). **e.** Vista detallada del epitelio simple plegado de la cámara ventral internamente rodeado de cutícula (flecha). **f.** Cámara ventral del receptáculo seminal de una hembra inmadura. El ovario (ov) conecta con el oviducto (od) el cual termina en una masa de células densamente empaquetadas formando un tejido particular (tp). La cámara ventral presenta un epitelio de células columnares (ep) y está lleno de secreciones del receptáculo seminal (s). **g.** Hembra madura que se ha vuelto no receptiva recientemente sin desovar. Células densamente empaquetadas formando un tejido particular (tp) son observadas en la unión del oviducto (od) y la cámara ventral (cv). **h.** Vista detallada de las células densamente empaquetadas del tejido particular (tp) en la unión del oviducto (od) y la cámara ventral. Notar el epitelio columnar (ep) de la cámara ventral y el epitelio del oviducto de células planas (flechas).

Duración de la receptividad: factores involucrados

Los estudios de corto plazo mostraron que la duración de la receptividad se extendió entre dos y 16 días en hembras de LMC, y entre uno y 12 días en hembras de SAO. Se encontraron diferencias en la duración de la receptividad entre los factores “estado reproductivo de la hembra” (hembras que desovaron y hembras que no desovaron) ($F=53.34$, $p<0.0001$), y el área de estudio ($F=447.68$, $p<0.0001$): las hembras que desovaron presentaron una receptividad más corta respecto de las que no desovaron y, las hembras de SAO presentaron una receptividad más corta respecto de las de LMC (Fig. 3.4, N_{LMC} hembras que desovaron=68, N_{LMC} hembras que no desovaron=55, N_{SAO} hembras que desovaron=62, N_{SAO} hembras que no desovaron=16). Consecuentemente, se distinguieron para ambas áreas de estudio, dos tipos de hembras: [1] hembras que siempre desovaron y presentaron una receptividad “corta” la cual se extendió entre dos y seis días (3.81 ± 1.3) en LMC y entre uno y cuatro días (2.17 ± 0.97) en SAO; y [2] hembras que no desovaron las cuales presentaron una receptividad “extendida” la cual se extendió entre siete y 16 días (9.65 ± 3.08) en LMC, y entre cinco y 12 días en SAO (6.55 ± 1.81). En las hembras receptivas, ambos opérculos, derecho e izquierdo, se volvieron móviles simultáneamente.

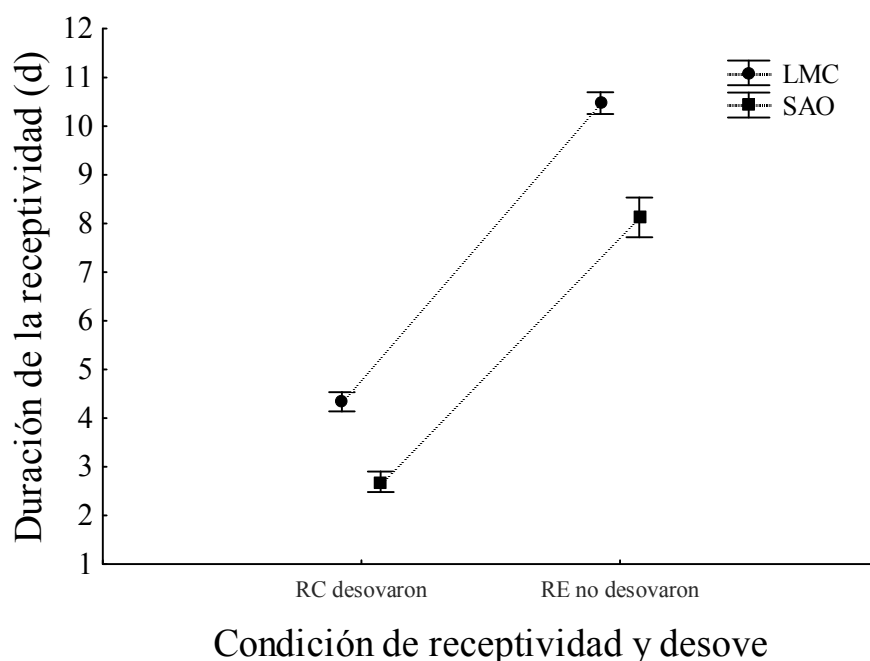


Fig. 3.4. Duración de la receptividad en días (d) entre los factores: “condición de receptividad y desove” incluyendo hembras de receptividad corta (RC) que desovaron y hembras de receptividad extendida (RE) que no desovaron; y “áreas de estudio” incluyendo Laguna Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). (Los símbolos representan la media y las líneas verticales el desvío estándar).

El ANCOVA de dos vías mostró que la duración de la receptividad de las hembras dependió del tipo de hembra –con receptividad corta y desove *versus* con receptividad extendida y sin desove– ($F=192.64$, $p<0.0001$), y del área de estudio ($F=36.96$, $p<0.0001$), aunque no estuvo relacionada con la talla de las hembras ($F=0.31$, $p=0.58$). El ANOVA de tres vías mostró que la duración de la receptividad no estuvo relacionada con la presencia de machos ($F=0.56$, $p=0.46$), aunque fue dependiente del tipo de hembra ($F=279.95$, $p<0.0001$) y del área de estudio ($F=72.28$, $p<0.0001$). El ANCOVA de dos vías mostró que la duración de la receptividad estuvo relacionada con el tipo de hembra ($F=117.18$, $p<0.0001$), el área de estudio ($F=38.48$, $p<0.0001$) y el peso de los receptáculos seminales ($F=24.61$, $p<0.01$). Un ANOVA de dos vías posterior mostró diferencias en el peso de los receptáculos seminales respecto del tipo de hembra ($F=56.02$, $p<0.0001$), el área de estudio ($F=5.19$, $p<0.05$), y entre la interacción de ambos factores ($F=4.86$, $p<0.05$): hembras con receptividades cortas de ambas áreas de estudio tuvieron peso similar del receptáculo seminal, mientras que las hembras con receptividad extendida tuvieron receptáculos seminales de menor peso respecto de las de receptividad corta y, diferente entre sí, dado que las hembras con receptividades extendidas de SAO tuvieron mayor peso del receptáculo seminal respecto de las hembras de receptividad extendida de LMC (Fig. 3.5). Todas las hembras diseccionadas presentaron ovarios en su último estadio de desarrollo caracterizados por su consistencia granular y color violeta, independientemente de la duración de la receptividad.

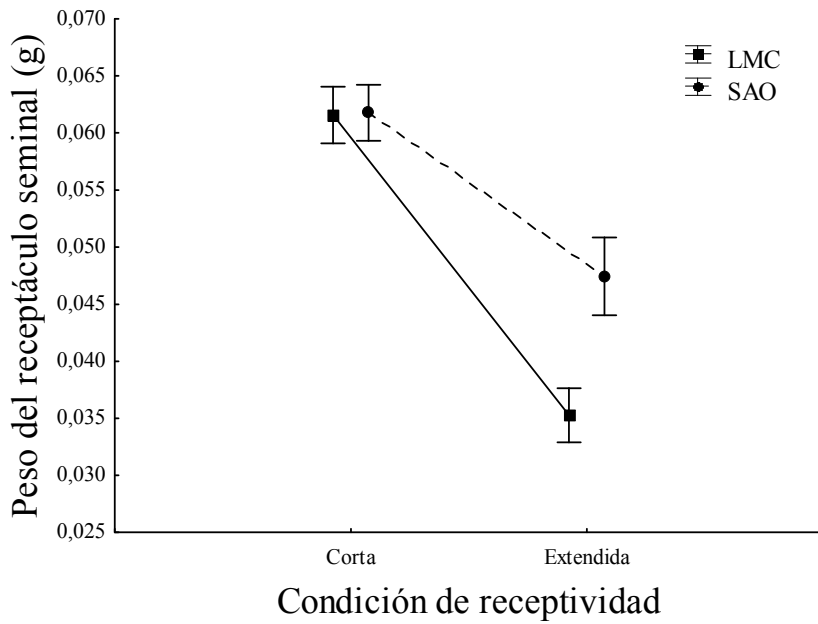


Fig. 3.5. Peso de los receptáculos seminales en gramos (g) entre los factores: “condición de receptividad” incluyendo hembras de receptividad corta y extendida; y “áreas de estudio” incluyendo Laguna Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). (Los símbolos representan la media y las líneas verticales el desvío estándar).

Se encontraron diferencias en la proporción de los dos tipos de hembras, con receptividad corta que desovaron y con receptividad extendida que no desovaron, entre áreas de estudio ($\chi^2=13.33$, $p<0.001$, $N_{LMC}=123$, $N_{SAO}=78$): en SAO se encontró una mayor proporción de hembras que desovó respecto de las que no desovaron ($\chi^2=33.64$, $p<0.001$), mientras que proporciones similares de ambos tipos de hembras fueron encontradas en LMC ($\chi^2=0.92$, $p=0.34$) (Fig. 3.6).

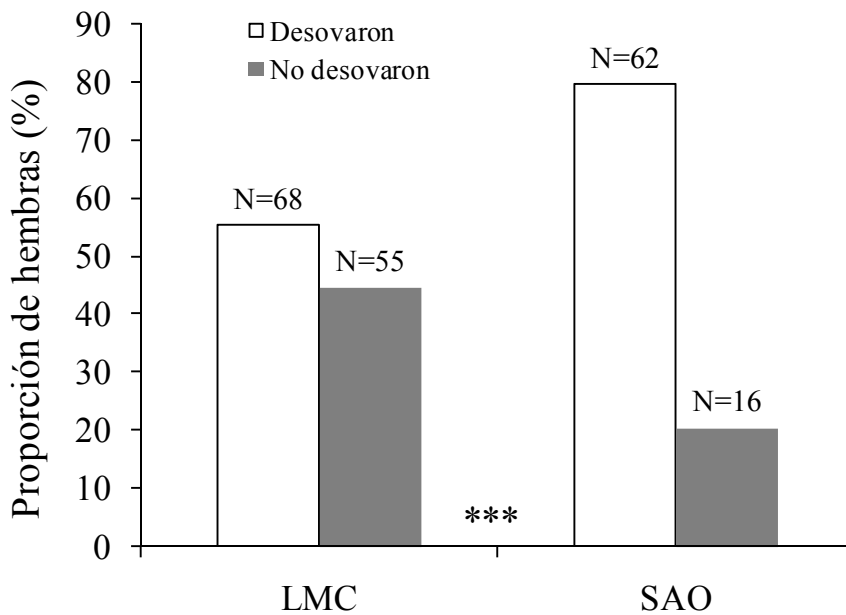


Fig. 3.6. Proporción (%) de hembras de *Neohelice granulata* que desovaron o no en la Laguna de Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). (***) $p<0.001$.

Se encontraron diferencias en la duración de la receptividad de las hembras entre los diferentes meses de la estación reproductiva en LMC (Kruskal-Wallis, $H=43.31$, $p<0.001$, $N_{total}=118$). Los resultados del test de Student-Newman-Keuls posterior mostraron que la duración de la receptividad se acortó a lo largo de la estación reproductiva: durante los meses de septiembre-octubre-noviembre las hembras presentaron receptividades extendidas de siete a 12 días (8.16 ± 3.2), durante noviembre-diciembre las hembras tuvieron periodos receptivos de duración intermedia de seis a ocho días (6.6 ± 2.6), y durante diciembre-enero-febrero las hembras presentaron periodos receptivos cortos de tres a cinco días (4.9 ± 2.1) (Fig. 3.7).

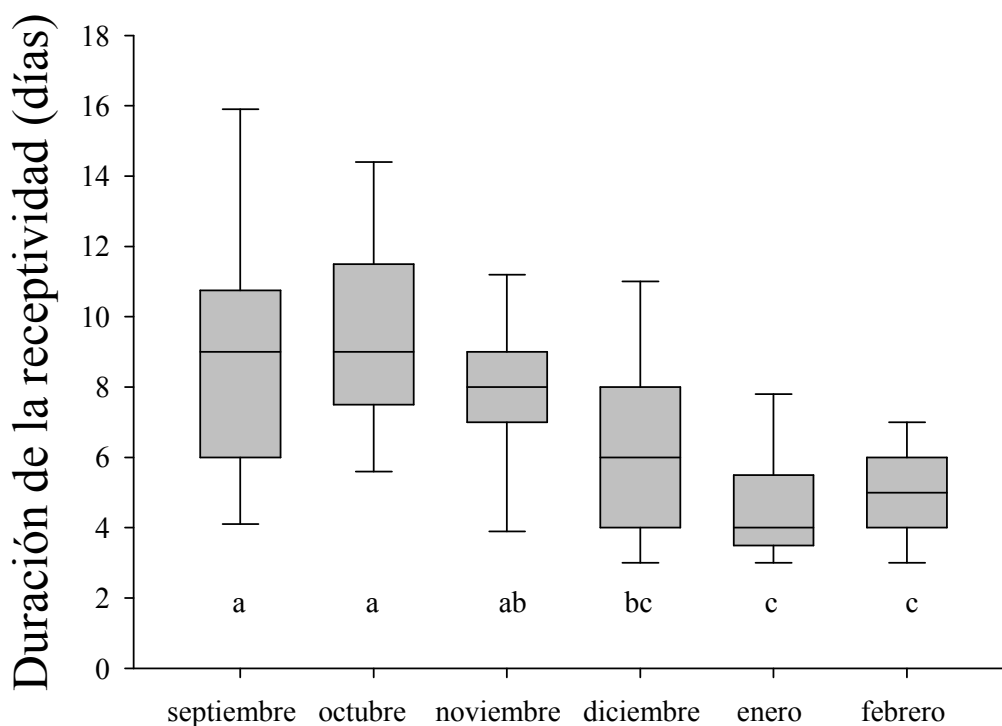


Fig. 3.7. Duración de la receptividad de hembras de *Neohelice granulata* durante los meses de la estación reproductiva en la Laguna Mar Chiquita. Letras diferentes indican diferencias significativas luego de un test de Student-Newman-Keuls ($p<0.001$).

Los estudios a largo plazo mostraron que hembras individuales pudieron adquirir la condición de receptivas y desovar durante un mismo período reproductivo hasta

cuatro veces (3.56 ± 0.67) las de LMC, y dos (1.62 ± 0.48) las de SAO. Estas diferencias entre áreas de estudio fueron significativas ($t=7.49$, $p<0.0001$; LMC: $N_{\text{con machos}}=5$, $N_{\text{sin machos}}=11$, SAO: $N_{\text{con machos}}=7$, $N_{\text{sin machos}}=10$).

Experimentos de ruptura de espermátóforos

Se encontraron diferencias en la cantidad de EPF intactos entre tratamientos (Kruskal-Wallis, $H=30.24$, $p<0.001$). El test de Student-Newman-Keuls posterior mostró diferencias en los tratamientos 2 y 3 (en los cuales se incubaron EPF con el receptáculo seminal de hembras receptoras y no receptoras, respectivamente) con respecto a los tratamientos 1, 4 y 5 (donde los EPF se incubaron solos, o con ovocitos de hembras receptoras y no receptoras, respectivamente) (Fig. 3.8). En los primeros, se encontraron pocos EPF y muchos espermatozoides libres, mientras que en los últimos se encontró gran cantidad de EPF intactos. Por lo tanto, las secreciones del receptáculo seminal tanto de hembras receptoras y como de las no receptoras podrían estar involucradas en los mecanismos de ruptura de la pared de los EPF, mientras que los ovocitos de ambos tipos de hembras parecerían no intervenir en esta función.

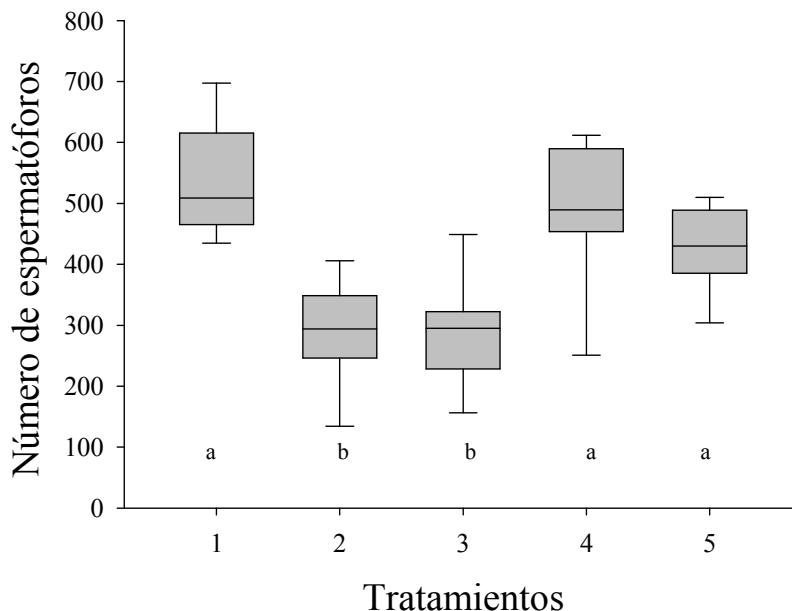


Fig. 3.8. Número de espermátóforos (ESP) cuantificados en los tratamientos, 1, un control de ESP solos, 2, ESP + receptáculo seminal de una hembra receptiva, 3, ESP + el receptáculo seminal de una hembra no receptiva, 4, ESP + ovocitos de una hembra receptiva y, 5, ESP + ovocitos de una hembra no receptiva. Letras diferentes indican diferencias significativas luego de un test de Student-Newman-Keuls ($p<0.001$).

Discusión

Estos resultados sugieren que las hembras de *Neohelice granulata* tendrían la capacidad de regular la duración del período de receptividad y el momento del desove. Por lo tanto, las hembras podrían controlar el momento de la fecundación de acuerdo con diferentes mecanismos internos relacionados con la morfología de la vulva, el peso del contenido del receptáculo seminal y atributos anatómicos de éste.

Para la mayoría de los cangrejos grapsoides, la duración de la receptividad se desconoce, aunque se pueden distinguir dos grandes grupos: hembras que se encuentran siempre morfológicamente capaces de copular y hembras cuya receptividad se encuentra restringida morfológicamente a determinados momentos, cuando el opérculo de la vulva se vuelve móvil (ver Brockerhoff y McLay 2005c). Las hembras de *N. granulata* estuvieron receptivas y desovaron varias veces durante una misma estación reproductiva, aunque solo durante un período restringido cada vez, por lo cual pertenecen al segundo grupo descrito anteriormente. La presencia de un opérculo móvil en hembras de *N. granulata* indicando el período de receptividad es similar a lo descrito para otros Grapsiodea (Brockerhoff y McLay 2005a, b, c; Hartnoll 1965, 1968; Seiple y Salmon 1982). Hasta el momento, se había sugerido que la capacidad de la vulva de volverse móvil ocurre debido a un proceso de descalcificación (Hartnoll 1969; Henmi y Murai 1999). Sin embargo, este proceso se demuestra en el presente capítulo dado los diferentes niveles de calcio encontrados en la membrana de la vulva entre hembras receptivas y no receptivas. Respecto de la presencia de setas en el opérculo de la vulva de las hembras de *N. granulata*, su morfología es similar a las setas en forma de “cúspide” descritas por Beninger et al. (1991) para el primer gonopodo de los machos de *Chionoecetes opilio*, por Garm (2004) para la maxila de *Cherax quadricarinatus*, y por Scelzo et al. (2010) para el gonoporo de las hembras de *Pagurus exilis*. Una función probable del tipo mecano-receptora fue sugerida para este tipo de setas dada su inserción infracuticular, permitiendo los movimientos del gonopodo durante la eyaculación (Beninger et al. 1991). Una función similar puede ser también sugerida para las setas del opérculo de la vulva de hembras de *N. granulata*, las cuales podrían facilitar el posicionamiento del gonopodo durante la cópula.

El receptáculo seminal de *N. granulata* fue inicialmente descrito por López Greco et al. (1999) quien indicó que pertenecería al tipo “ventral” descrito por Diesel

(1991). En el presente capítulo se provee información más detallada respecto del tipo celular encontrado en la cámara dorsal secretora y en la ventral, lo cual se corresponde con la anatomía descrita para otros Brachyura (Ryan 1967; Johnson 1980; Beninger et al. 1988; Diesel 1989; Sainte-Marie y Sainte-Marie 1998). Sin embargo, se encontraron diferencias entre hembras receptoras y no receptoras de *N. granulata* respecto de la función secretora del epitelio de la cámara dorsal y la presencia de un tejido particular en la unión del oviducto y el receptáculo seminal. Respecto de las secreciones producidas por las células glandulares de la cámara dorsal, se han propuesto diferentes funciones para las mismas, como por ejemplo, mantenimiento del espermatozoides viable (Subramoniam 1993; Anilkumar et al. 1996), ruptura de la pared de los espermatóforos (Ryan 1967; Diesel 1989; Anilkumar et al. 1999), o facilitar la remoción del espermatozoides degradado (Sal Moyano et al. 2010). En el presente capítulo, las secreciones en hembras no receptoras fueron más abundantes y formaron vesículas, lo cual indicaría que las secreciones estarían involucradas en el mantenimiento del espermatozoides viable durante el estadio no receptoro, dado que las hembras de *N. granulata* pueden desovar varias veces sin copular previamente cada vez en una misma estación reproductiva (López Greco et al. 1999). De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento de ruptura de la pared de los espermatóforos, las secreciones del epitelio dorsal podrían también estar involucradas en la ruptura de los espermatóforos, aunque no se encontraron diferencias entre las secreciones de hembras receptoras y no receptoras.

Respecto de la presencia del tejido particular en la unión del oviducto y el receptáculo seminal, este fue inicialmente descrito para el grapsóideo *Eriocheir sinensis* y denominado como un tejido “valvular” (Lee y Yamazaki 1990). Durante el desove, este tejido impediría que el espermatozoides ingrese en el oviducto y favorecería que los ovocitos ingresen en el receptáculo seminal, como fue sugerido para algunos ocapódidos (Lautenschlager et al. 2010). Más recientemente, este tipo de tejido fue también encontrado en cangrejos pinotéridos y denominado como un tejido de “transferencia holocrina” a través del cual los ovocitos deben pasar mediante las secreciones holocrinas durante la ovulación (Becker et al. 2011). Podría ser propuesto que este tejido funcionaría como un mecanismo adicional de las hembras el cual les permitiría elegir el momento de fecundar los ovocitos, dado que éste se encontró presente en hembras que no desovaron y ausente en las que sí lo hicieron. De esta manera, puede sugerirse que si las hembras lograran controlar y retrasar la fecundación, mientras

continúan apareándose, se acumularía más esperma proveniente de distintos machos en el receptáculo seminal, y de esta forma, se favorecería la competencia espermática.

Los factores que afectan la duración del período de receptividad de hembras han sido poco estudiados. En diferentes especies de cangrejos grapsóideos tales como *Hemigrapsus sexdentatus* fue demostrado que en ausencia de machos, las hembras pueden extender su receptividad (Brockhoff y McLay 2005a, b); mientras que en *Cyclograpsus lavauxi* y *Helice crassa* la duración de la receptividad fue independiente de la talla de las hembras y la presencia de machos en estudios a corto y largo plazo (Brockhoff y McLay 2005c). En *N. granulata* fue demostrado que la duración de la receptividad fue independiente de la talla de las hembras y la presencia de machos, aunque fue dependiente del contenido del receptáculo seminal: hembras con receptáculos seminales con escaso contenido de esperma presentaron una receptividad extendida, mientras que hembras con receptáculos seminales con gran contenido de esperma presentaron una receptividad corta. Es posible que las hembras de muchas especies de Decápodos puedan registrar la cantidad de esperma acumulado (Sainte-Marie 2007), como parece ser el caso de algunos insectos (e. j. Sakurai 1998; Wedell 2005). Fue sugerido que en la langosta americana, *Homarus americanus*, las hembras podrían monitorear el contenido de esperma acumulado, y de esta forma, regular la cantidad de apareamientos de acuerdo a la cantidad de esperma requerido, durante el período de intermuda (Atema y Steinbach 2007). En este estudio, se sugiere que las hembras con receptáculos seminales con escaso contenido de esperma exhibirían un período de receptividad extendido para copular con nuevos machos y (re)llenar sus receptáculos seminales, en los cuales el esperma sería mezclado y, consecuentemente, se favorecería la competencia espermática. La acumulación de esperma en el receptáculo seminal les otorga a las hembras la oportunidad de acumular esperma proveniente de distintos machos (e. j. Diesel 1991; Jensen et al. 1996; Gosselin et al. 2005; Sainte-Marie 2007), resultando en una progenie genéticamente diversa (Eberhard y Cordero 1995). En el caso de *N. granulata*, las hembras con receptividad corta se beneficiarían por tener un período receptivo corto para evitar el riesgo de predación mientras son cuidadas o copuladas por los machos y para evitar el riesgo de ser lastimadas durante los enfrentamientos entre machos. La acumulación de esperma reduciría la frecuencia de apareamiento de las hembras, y por lo tanto, disminuiría el riesgo de stress físico y de predación mientras buscan pareja (Morgan et al. 1983; Koga

et al. 1998), el riesgo de ser lastimadas por machos o de infección por microbios (Elner y Beninger 1995).

Las diferencias entre hembras de *N. granulata* que desovaron o no podrían estar relacionadas con la duración de la receptividad, la carga del receptáculo seminal y la competencia espermática: en hembras con períodos receptivos cortos y receptáculos seminales llenos, la mezcla del espermatozoide habría ocurrido y no necesitarían volver a copular para llenar sus receptáculos, por lo cual, podrían fecundar a todos los ovocitos; mientras que en hembras con períodos receptivos extendidos, los receptáculos seminales se encuentran vacíos o con poco espermatozoide, por lo cual, no ocurriría el desove dado que existiría una baja probabilidad de fecundar a todos los ovocitos. Es probable que estas hembras, durante su período extendido de receptividad, puedan copular con muchos machos para llenar sus receptáculos seminales, y de esta forma, favorecer la competencia espermática. Dado que todas las hembras receptivas, independientemente de su receptividad corta o extendida, tienen ovarios en su último estadio de desarrollo, indica que la maduración del ovario no está solo ligada al desove. Aunque en el presente capítulo, las hembras con receptividades extendidas no desovaron, bajo otras condiciones experimentales como colocando una hembra con más de un macho, es esperable que la hembra copule con varios machos, llene su receptáculo seminal y, consecuentemente, desove o tenga la capacidad de acortar el período de receptividad. Esta cuestión podrá ser dilucidada en un futuro mediante experimentos específicos.

Para hembras de *N. granulata* de LMC, los cambios en la duración del período receptivo durante la estación reproductiva podrían explicarse de la siguiente forma: durante los primeros meses, es más probable que las hembras tengan poco espermatozoide remanente en sus receptáculos seminales proveniente de cópulas previas, realizadas durante la estación reproductiva anterior, por lo cual, estas hembras necesitarían copular para llenar sus receptáculos seminales. En este sentido, López Greco et al. (1999) demostraron que el receptáculo seminal de *N. granulata* muestra variación estacional, con el menor tamaño observado en otoño, antes del comienzo de la estación reproductiva. Por el contrario, al final de la estación reproductiva, las hembras se habrían vuelto receptivas y desovado gran cantidad de veces (hasta cuatro veces, este estudio; y hasta seis veces, Ituarte et al. 2004), por lo cual, habrían copulado con muchos machos cada vez, llenando sus receptáculos seminales, y por lo tanto, exhibiendo períodos receptivos cortos. Una estrategia similar fue descrita en cangrejos

violinistas del género *Uca*, en los cuales fue demostrado que al comenzar el período de apareamiento, luego de elegir una pareja, las hembras tardan más en ovular en comparación con las hembras que se aparean durante el pico del período reproductivo (Jormalainen 1998).

Las diferencias encontradas respecto del número de veces que las hembras se volvieron receptivas entre áreas de estudio, podría ser debida a las condiciones ambientales diferenciales. Ituarte et al. (2006) demostraron que el comienzo y la duración de la estación reproductiva variaron entre LMC y SAO, comenzando más tarde y siendo más corta en SAO, dado que los ovarios de las hembras no maduraron completamente durante el invierno, probablemente debido a una deficiente alimentación relacionada con el tipo de ambiente. Además, otros estudios demostraron que la duración del período de desarrollo del embrión fue similar en ambas áreas de estudio (Bas et al. 2008). Consecuentemente, las hembras de SAO se podrían haber vuelto receptivas menor cantidad de veces (la mitad) en una misma estación reproductiva, dado que la duración de la misma es más corta respecto de LMC.

Los resultados mostrando que las hembras de SAO con receptividades extendidas presentaron receptáculos seminales más pesados que las hembras con receptividades extendidas de LMC podría deberse a que la fecundidad de las hembras de SAO es ≈ 35 a 50% menor que las hembras de LMC (Bas et al. 2007). Por lo tanto, las hembras de SAO utilizarían menos esperma acumulado en sus receptáculos seminales para fecundar a todos los ovocitos extruidos. Por el otro lado, el peso similar de los receptáculos seminales de hembras de receptividades cortas de ambas áreas de estudio, indica que las hembras pueden llenar sus receptáculos seminales hasta una misma capacidad: aunque las hembras de LMC presentan una fecundidad mayor respecto de las de SAO, también presentan un período de receptividad más extendido, y además, pueden volverse receptivas una mayor cantidad de veces durante una misma estación reproductiva, por lo cual, podrían copular con muchos machos cada vez, explicando, de esta manera, los pesos similares encontrados.

En conclusión, en el presente capítulo se propone que las hembras de *N. granulata* exhibirían flexibilidad en la duración del período receptivo y en el momento del desove de acuerdo al contenido de esperma acumulado en sus receptáculos seminales. Hembras con receptáculos seminales vacíos o con poco esperma podrían extender su receptividad para copular con mayor cantidad de machos, y de esta manera,

favorecer la competencia espermática. En hembras con receptáculos seminales llenos, la mezcla de esperma proveniente de distintos machos habría ocurrido, su período receptivo es más corto, y las hembras podrían no copular aunque sí desovan.



Capítulo IV

Señales involucradas en la elección de la pareja
en *Neohelice granulata*

Señales involucradas en la elección de la pareja en *Neohelice granulata*

Introducción

En un gran número de especies, los apareamientos no ocurren al azar dado que existe un proceso de elección de pareja por parte de alguno de los dos sexos (Harvey y Bradbury 1991). Los mecanismos utilizados en la elección de la pareja son el resultado del proceso de selección sexual. En este contexto, la selección sexual ha sido tradicionalmente considerada como el resultado de la competencia directa entre machos, y la elección de éstos por parte de las hembras (Darwin 1871; Bateman 1948; Trivers 1972), aunque en muchos casos se ha registrado el caso opuesto (Berglund et al. 1996; Reading y Backwell 2007). En poblaciones en las cuales existe una relación operacional de sexos (ROS) desviada en favor de los machos, o cuando existe competencia intra-específica y los machos defienden recursos utilizados para el apareamiento, como las cuevas, se puede predecir que existirá elección de éstos por parte de las hembras (Backwell y Passmore 1996; Reading y Backwell 2007). En el caso de los machos, la elección es predicha en especies donde la calidad de las hembras es variable, la inversión de los machos en el apareamiento es alta y existe una alta probabilidad de atraer a hembras receptivas (Kokko y Johnstone 2002; Reading y Backwell 2007).

En relación a los criterios utilizados en la elección de la pareja, muchos estudios se basaron en el reconocimiento de un único criterio de elección, como por ejemplo el desarrollo desproporcionado de un carácter sexual secundario (e. j. la cola de mayor longitud en las aves). Sin embargo, también se ha propuesto que existen múltiples criterios de elección utilizados en la evaluación y elección de la pareja (Burley 1981; Thornhill 1983; Balmford et al. 1992; Pomiankowski y Iwasa 1993). Más específicamente, en estudios en los que se han considerado múltiples criterios, se estableció que las hembras podrían seleccionar a sus parejas de acuerdo al fenotipo del macho, como así también de acuerdo a la capacidad de los mismos en defender sus recursos (e. j. Thornhill 1983; Thompson 1986; Balmford et al. 1992).

En muchas especies de crustáceos, los machos constituyen el sexo involucrado en la búsqueda de la pareja, mientras que las hembras emiten las señales para atraerlos (Krang y Baden 2004). Sin embargo, la búsqueda y elección por parte de las hembras puede ser también común en aquellas especies en las cuales los machos defienden importantes recursos, como por ejemplo, las cuevas construidas por ellos (Popper et al. 2001). Adicionalmente, las hembras de muchas especies tienen la capacidad de aparearse repetidamente con diferentes machos a lo largo de su ciclo reproductivo (Hartnoll 2000). Esta característica podría explicar el motivo por el cual las hembras serían más selectivas respecto de los machos, dado que mediante la cópula con diversos machos, promueven la competencia espermática dentro de su receptáculo seminal (Thiel y Duffy 2007). Además, la preferencia por parte de las hembras en la elección de la pareja contribuiría a aumentar la varianza del éxito reproductivo de los machos y favorecería la selección sexual de determinados caracteres de los mismos. En este contexto, la elección por parte de las hembras debería desarrollarse cuando las mismas obtienen beneficios directos como resultado de la elección de la pareja (Wellborn y Cothran 2007).

La selección de la pareja requiere del intercambio de señales entre ambos sexos. Una definición actual de señal indica que: “una señal es una característica del fenotipo de un individuo que se desarrolla cuando la misma estimula una respuesta en otro u otros organismos y, de esta forma, aumenta el *fitness* del individuo emisor” (Christy y Rittschof 2011). Otros autores, sugieren además, que mediante dicho mecanismo, se aumenta también el *fitness* del individuo receptor (Maynard Smith y Harper 2003; Scott-Phillips 2008). Más específicamente, la elección de la pareja podría depender de señales que incluyen factores intrínsecos y extrínsecos (Thiel y Duffy 2007). Entre los primeros, se incluyen caracteres morfológicos o fisiológicos de los individuos involucrados, como por ejemplo, el tamaño del cuerpo o de la quela de los machos, o el estado reproductivo de las hembras, basado en el estadio de desarrollo de los ovarios o de los embriones. Entre los segundos, se incluyen los diversos tipos de señales, tales como la liberación de sustancias químicas como feromonas al agua, o la emisión de señales visuales, acústicas o táctiles, para atraer a la pareja.

Dado que se ha asumido que el mecanismo clásico de selección sexual es la elección de la pareja por parte de las hembras (Jormalainen 2007), respecto de los factores intrínsecos, las hembras obtendrían tanto beneficios directos, como por

ejemplo, un mejor recurso defendido por los machos o mayores probabilidades de fecundación de sus ovocitos, debidos a la mejor calidad del macho, como también beneficios indirectos, basados principalmente en la obtención de “buenos genes” en su descendencia (Andersson 1994). De esta manera, las hembras deberían elegir entre distintos machos que diferirían entre sí de acuerdo a su capacidad de proveer tanto beneficios directos como indirectos (Jormalainen 2007). En este sentido, los sistemas de apareamiento en los cuales los machos de mayor talla son los dominantes y los que obtienen el mayor éxito reproductivo, son comúnmente descriptos para diversas especies de crustáceos decápodos (hipótesis de la “ventaja de la talla”: Warner 1975, Charnov 1979). Por otro lado, la frecuencia de apareamiento de los machos también constituye un factor influyente a la hora de la elección de la pareja por parte de las hembras, debido a que la cantidad de esperma transferido disminuye con la frecuencia de cópula, estableciéndose limitación espermática en machos apareados (Sato y Goshima 2006).

En relación a los factores extrínsecos, la elección de la pareja depende de los comportamientos de cortejo, los cuales involucran diversos tipos de señales utilizadas para atraer a la pareja y evaluar su calidad, como por ejemplo, las señales químicas, visuales, acústicas o táctiles. Sin embargo, se conoce poco acerca de la manera en la cual los individuos adquieren información en relación a la calidad de las parejas potenciales y de qué manera esa información es utilizada en el apareamiento. Algunos estudios realizados en crustáceos indicaron la importancia de las señales químicas durante las interacciones de comportamiento reproductivo (Dunham 1988; Bushmann y Atema 2000). Como señales químicas, se reconocen principalmente a las feromonas, las cuales son emitidas y recibidas por individuos de la misma especie, con el objetivo de provocar una reacción específica (Wyatt 2010). La elección de la pareja mediante el uso de señales químicas por uno u otro sexo, o por ambos, parecería variar entre especies y dependería del contexto social de cada una de ellas (Borowsky 1985; Kamio et al. 2000, 2002; Raethke et al. 2004). En las especies de crustáceos acuáticas, el cortejo involucra la liberación de feromonas por parte de las hembras receptoras las cuales provocan la atracción de los machos (e. j. Gleeson et al. 1984; Dunham 1988; Christy y Rittschof 2011). Éstos iniciarían distintos tipos de comportamientos reproductivos tales como el cortejo, pre-cópula o cópula (e. j. Eales 1974; Kamio et al. 2002).

Se han realizado estudios que señalan que la liberación de las señales químicas provienen de fuentes diversas, como la orina (e. j. Ryan 1966; Salmon 1983; Gleeson et al. 1984; Bushmann 1999; Bushmann y Atema 2000) o los ovarios maduros (Hinsch 1968; McCleese et al. 1977). Se ha sugerido que en aquellas especies en las cuales el proceso de muda se encuentra asociado al apareamiento, el tipo de feromona involucrada se correspondería con los ecdiesteroides, dado que se ha demostrado que la concentración de los mismos varía durante el desarrollo embrionario y durante el desarrollo de los ovarios (Okazaki y Chang 1991; Young et al. 1991). Además, se ha considerado que los ecdiesteroides son importantes reguladores de la reproducción en las hembras (Subramoniam 2000; Chang y Kaufman 2005). Sin embargo, la función que cumplirían los ecdiesteroides en la reproducción de los machos es menos conocida (Chang y Sagi 2008), aunque también se ha sugerido que éstos liberan feromonas en la orina, las cuales estarían relacionadas con los comportamientos agonísticos entre machos (Breithaupt y Atema 2000; Breithaupt y Eger 2002), y con la atracción de las hembras (Sato y Goshima 2007).

Alternativamente a la liberación de sustancias químicas al medio, existen mecanismos adicionales de reconocimiento de la pareja tales como: [1] las señales visuales (Salmon 1983; Christy y Salmon 1991; Christy y Dan Rittschof 2011), [2] las señales químicas detectadas mediante el contacto entre individuos dado que existe evidencia de la liberación de hormonas sexuales de “contacto” las cuales constituyen exudados cuticulares que inducirían la cópula (Kamio et al. 2002; Caskey y Bauer 2005; Ekerholm y Hallberg 2005; Herborg et al. 2006; Bauer 2011), y [3] las señales acústicas (Salmon y Horch 1972; Popper et al. 2001). Los tipos de señal [1] y [3] fueron comúnmente registrados para especies semi-terrestres de decápodos, principalmente ocipódidos, mientras que el tipo [2] fue registrado para especies tanto acuáticas como semi-terrestres.

En la Laguna Costera de Mar Chiquita, debido al régimen semi-diurno de mareas, *Neohelice granulata* se encuentra cubierto por agua durante la pleamar y expuestos durante marea baja. De acuerdo a observaciones preliminares de campo, como parte de este estudio, se registró que los individuos pueden copular tanto fuera como dentro de las cuevas y tanto durante la marea baja como alta. Esto indicaría que los individuos estarían utilizando distintos tipos de señales, visuales y químicas, involucradas en la atracción y elección de la pareja. Además, otros factores relacionados

con la talla de los machos podrían estar involucrados en la elección de la pareja, dado que en el capítulo II se demostró que las cuevas construidas y defendidas por los machos son recursos utilizados para el apareamiento y que la forma de las mismas depende de la talla del macho. Asimismo, factores relacionados con el estado reproductivo de machos y hembras, como la presencia de machos apareados *versus* no apareados o hembras receptivas *versus* no receptivas, respectivamente, podrían influenciar el proceso de elección de la pareja.

Hipótesis

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se plantea como hipótesis general del presente capítulo que la selección de la pareja en *Neohelice granulata* está basada en la elección de machos por parte de las hembras. Como hipótesis derivadas se establece que las hembras receptivas eligen:

- [1] a los machos grandes,
- [2] a los machos no apareados,
- [3] mediante el uso de señales químicas y visuales.

Objetivos

En este contexto, el objetivo general del presente capítulo fue determinar si en *Neohelice granulata* la selección de pareja está basada en la elección por parte de hembras o de machos. Como objetivos específicos se planteó estudiar si el proceso de selección depende de/del:

- [1] la categoría de los individuos: hembras receptivas y no receptivas, machos grandes y chicos, y machos apareados o no apareados, y
- [2] tipo de señales posiblemente involucradas, visuales y químicas.

Materiales y métodos

Los individuos de *Neohelice granulata* maduros (>19 mm AC, López Greco y Rodríguez 1998) fueron colectados en la Laguna Mar Chiquita, entre septiembre y febrero de las estaciones reproductivas 2010-2011 y 2011-2012, y transportados al

laboratorio. En el laboratorio, los individuos de distinto sexo se separaron y se mantuvieron en acuarios aireados con agua de mar (0.3x0.35x0.25 m, 3 cm de altura de agua de mar); bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (22°C-28°C). Se alimentaron día por medio con alimento balanceado y el agua fue cambiada dos veces por semana.

Se realizaron experimentos con el fin de testear los tipos de señales que estarían involucradas en la elección de la pareja. Para ello se utilizaron individuos de distintas categorías: [1] hembras receptivas y no receptivas (reconocidas por la movilidad del opérculo de la vulva, ver resultados capítulo III) de talla 23.3-29.5 mm AC y 24.2-30.1 mm AC, respectivamente; [2] machos grandes de 30-34 mm AC y machos chicos de 25-28 mm AC; [3] machos apareados de 26.4-32.1 mm AC y machos no apareados de 26.9-31.8 mm AC. En todos los experimentos, con el objetivo de evitar un posible efecto de la diferencia de talla entre sexos sobre la elección de la pareja, y de acuerdo a observaciones de las diferencias de tallas entre individuos que copularon entre sí, la diferencia de talla entre machos y hembras nunca excedió los 4 mm. Los machos apareados se obtuvieron una vez que fueron colocados con una hembra receptiva y se observó la cópula (reconocida porque ambos individuos presentaron su pleon abierto y el gonopodo del macho se observó inserto en la vulva de la hembra), e inmediatamente al finalizar la cópula, el macho fue separado y utilizado en los experimentos.

Con el objetivo de reconocer el tipo de señal involucrada en la elección de la pareja, se realizaron cuatro experimentos incluyendo los individuos pertenecientes a las distintas categorías descritas en el párrafo anterior. Los experimentos fueron diseñados de acuerdo con Sato y Goshima (2007). Se estudiaron dos tipos de señales, visual (V) y química. En el caso de la señal química, se consideraron dos criterios diferentes: [1] la liberación de una señal química a través de los poros de la cutícula mediante la cual la comunicación requiere del contacto entre los individuos (CC), y [2] la liberación de una señal química al agua mediante la cual ocurre la comunicación sin contacto entre individuos (SC).

Diseño experimental 1

Para testear el tipo de señal involucrada, visual y química –con y sin contacto– en el reconocimiento de la pareja, se procedió de la siguiente manera: se utilizaron cilindros de acrílico (12 cm diámetro, 20 cm alto) en tres tratamientos:

[1] transparentes sin perforaciones (testeo de la señal visual),

[2] opacos con perforaciones de 1 cm^2 , de modo que el cangrejo dentro del mismo pudiera sacar sus quelas o patas (testeo de la señal química con contacto), y

[3] opacos con perforaciones de 2 mm^2 , las cuales impiden que el cangrejo dentro del mismo pueda sacar partes de su cuerpo (testeo de la señal química sin contacto).

De acuerdo al tratamiento, se colocaron dos cilindros iguales en un acuario plástico común ($1 \times 0.4 \times 0.15\text{ m}$), al cual se le agregó agua de mar a diferentes niveles según el tratamiento: [1] 3 cm, [2] 1 cm, y [3] 3 cm. Rodeando la base de cada cilindro, a una distancia de 6 cm, se dibujó sobre el acuario de plástico común un círculo (Fig. 4.1a, b, c, d, e).



Fig. 4.1. Dispositivo del diseño de experimentación 1 mostrando **a.** el contenedor plástico común (color bordó), con los cilindros colocados en su interior a cada lado. Rodeando a cada uno de ellos, a una distancia de 6 cm, se observa el círculo dibujado sobre el contenedor, y en el centro, a igual distancia de cada cilindro, el cilindro en el cual se aclimató el individuo al cual se le midió la respuesta. **b.** Durante el experimento, en un tratamiento donde se midió la respuesta de un macho (sobre el círculo derecho) frente a una hembra receptiva y una no receptiva (colocadas en cada cilindro). Cilindros de experimentación correspondientes a los distintos tratamientos: **c.** transparente sin perforaciones. **d.** opaco con perforaciones de 1 cm^2 . **e.** opaco con perforaciones de 2 mm^2 .

De acuerdo a las distintas categorías de individuos seleccionados se realizaron cuatro experimentos:

[1] una macho chico y un macho grande colocados cada uno dentro de un cilindro + una hembra receptiva a la cual se le testeó la respuesta,

[2] una hembra receptiva y una hembra no receptiva de talla similar colocadas en cada cilindro + un macho al cual se le testeó la respuesta,

[3] un macho apareado y un macho no apareado de talla similar colocados cada uno en un cilindro + una hembra receptiva a la cual se le testeó la respuesta, y

[4] una hembra receptiva y una hembra no receptiva de talla similar colocadas cada una en un cilindro + un macho apareado al cual se le testeó la respuesta.

En los experimentos [1] y [2] los tres tipos de señales (V, CC, SC) fueron testeadas, mientras que, de acuerdo a los resultados obtenidos, en los experimentos [3] y [4] sólo se testearon las señales químicas (CC, SC). Cada experimento tuvo una duración de 30 min. En el caso de ambas señales químicas, los individuos fueron dejados en los cilindros un mínimo de 2 hs, permitiendo la liberación y acumulación de las posibles sustancias químicas involucradas en la comunicación (Jones y Hartnoll 1997). Los cangrejos a los cuales se le testeó la respuesta fueron colocados en un cilindro transparente ubicado en el centro del acuario plástico común, a una misma distancia respecto de cada cilindro, y fueron aclimatados durante 15 min previos al comienzo del experimento. Una vez que comenzó el experimento, el cilindro conteniendo al cangrejo al cual se le testeó la respuesta fue removido, de modo tal que el mismo pudiera moverse libremente dentro del acuario plástico común. Cada vez que el cangrejo ingresó, considerando cualquier parte del cuerpo que atravesó la línea de los círculos dibujados rodeando los cilindros, se contó el tiempo que el mismo estuvo en cada círculo durante los 30 min que duró el experimento. El tiempo total que el cangrejo pasó en cada círculo fue considerado como la variable dependiente.

Para cada experimento se realizaron test de t apareados con el objetivo de comparar el tiempo total pasado por el cangrejo en cada uno de los círculos. Posteriormente, con el objetivo de evaluar si existieron diferencias en la intensidad de la señal química con o sin contacto, en los experimentos [1] y [3], se realizaron test de t para comparar la respuesta a la señal química con y sin contacto de las hembras receptivas hacia los machos grandes y hacia los machos no apareados, respectivamente (ver sección Resultados). Se obtuvieron 10 réplicas para cada tratamiento.

Diseño experimental 2

Se realizó un segundo diseño experimental que consistió en colocar a una distancia de 1 m por encima de los cilindros, un contenedor plástico (0.15x0.10x0.15 m) adicional conectado al cilindro por medio de una manguera (4 mm diámetro) con regulación propia. En cada contenedor plástico se colocó un nivel de 5 cm de agua (Fig. 4.2).



Fig. 4.2. Dispositivo utilizado en el diseño de experimentación 2: contenedor plástico común (color bordó) conteniendo los cilindros opacos con perforaciones de 2 mm² y los contenedores adicionales (color amarillo), colocados 1 m por encima de los cilindros, con mangueras con regulación propia conectadas a sus respectivos cilindros. Rodeando a cada cilindro se observa el círculo dibujado.

Se realizaron dos tratamientos:

[1] se colocaron dos machos apareados de talla similar en cada uno de los cilindros + un macho apareado de talla similar en uno de los contenedores plásticos adicionales y un macho no apareado de talla similar en el otro contenedor plástico adicional + una hembra receptiva a la cual se le testeó la respuesta, y

[2] se colocaron dos machos no apareados de talla similar en cada uno de los cilindros + un macho no apareado de talla similar en uno de los contenedores plásticos adicionales y un macho apareado de talla similar en el otro contenedor plástico adicional + una hembra receptiva a la cual se le testeó la respuesta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño experimental 1 (ver sección Resultados), en ambos tratamientos sólo se utilizaron cilindros opacos con perforaciones de 2 mm^2 y un nivel de agua de 3 cm (señal química SC). Los cangrejos en los cilindros y contenedores plásticos adicionales fueron mantenidos durante un mínimo de 2 hs previas al inicio del experimento (Jones y Hartnoll 1997). La hembra a la cual se le testeó la respuesta fue aclimatada durante 15 min previos al inicio del experimento. En el comienzo del experimento, el cilindro conteniendo a la hembra fue removido de modo que la hembra pudiera desplazarse por el contenedor plástico común, y las mangueras de regulación fueron abiertas de forma que existió un goteo constante del agua de los contenedores plásticos adicionales hacia los cilindros. El experimento tuvo una duración de 30 min. El tiempo total que la hembra pasó en cada círculo fue considerado como la variable dependiente. Para cada tratamiento, se realizaron test de t apareados con el objetivo de comparar el tiempo total pasado por la hembra en cada uno de los círculos. Posteriormente, con el objetivo de evaluar si existieron diferencias en la intensidad de la señal química sin contacto entre los dos tratamientos, se realizó un test de t en el cual se comparó la respuesta a la señal química sin contacto de las hembras receptivas hacia los machos no apareados (un macho no apareado en el tratamiento [1] y tres machos no apareados en el tratamiento [2]). Se obtuvieron 10 réplicas para cada tratamiento.

Resultados

Diseño experimental 1

Experimento 1: macho grande versus macho chico + hembra receptiva

Respecto de la señal visual, no se encontraron diferencias en el tiempo que las hembras permanecieron en cada uno de los círculos ($t_v=1.49$; $p=0.171$; Fig. 4.3a). Por el contrario, se encontraron diferencias respecto de ambas señales químicas, con y sin

contacto: las hembras receptivas pasaron más tiempo en los círculos de los machos grandes ($t_{CC}=3.61$; $p<0.01$; $t_{SC}=4.63$; $p<0.01$; Fig. 4.3b, c; respectivamente).

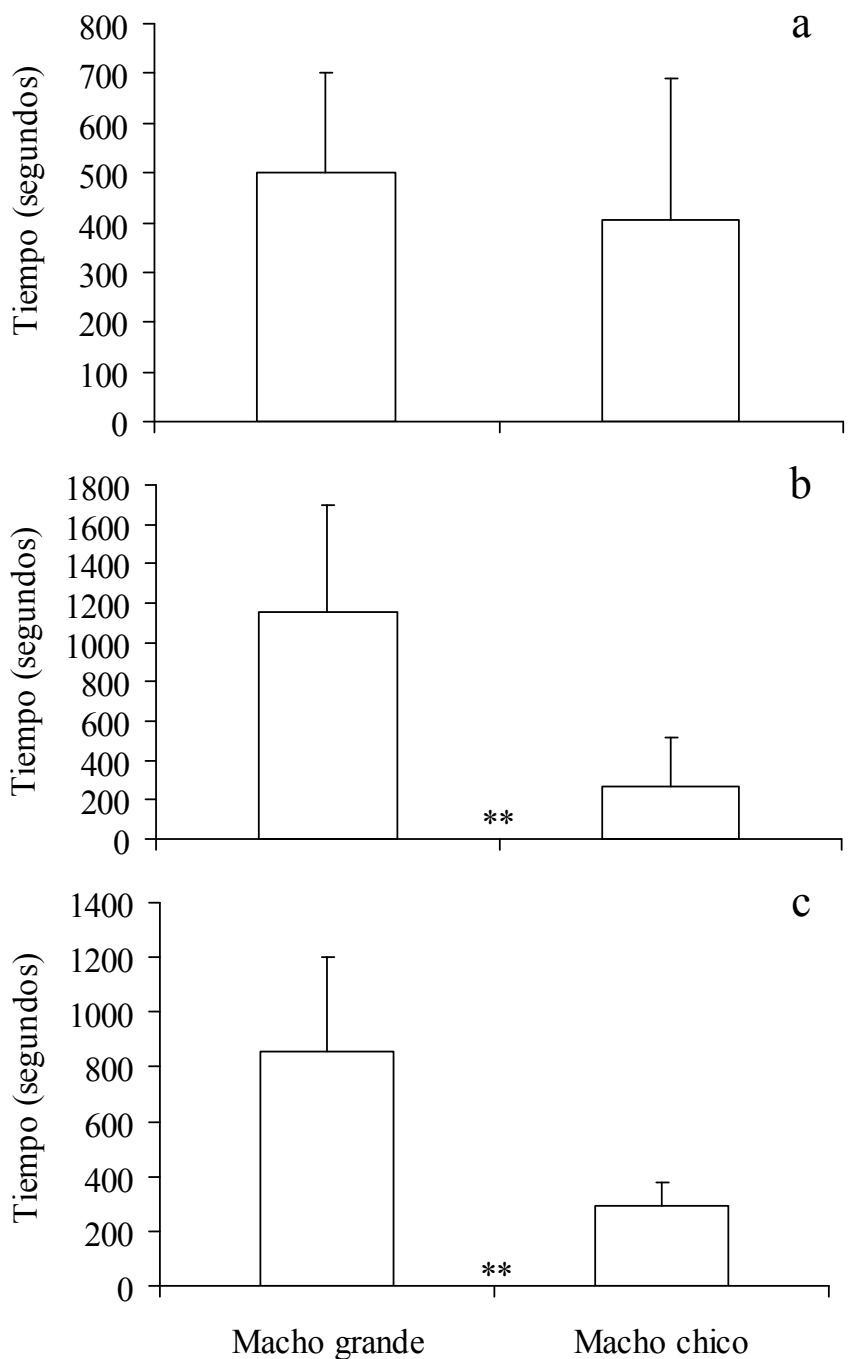


Fig. 4.3. Diseño experimental 1. Se testeó la respuesta de hembras receptoras de *Neohelice granulata* eligiendo (tiempo en segundos) machos grandes o chicos mediante la señal: **a.** visual, **b.** química con contacto, y **c.** química sin contacto, (** $p<0.01$).

Experimento 2: hembra receptiva versus hembra no receptiva + macho no apareado

Respecto de ambos tipos de señales, visual y química (con y sin contacto), no se encontraron diferencias en el tiempo que los machos permanecieron en cada uno de los círculos entre hembras receptivas y no receptivas ($t_v=0.21$, $p=0.837$; $t_{CC}=1.07$, $p=0.312$; $t_{SC}=0.08$, $p=0.937$; respectivamente).

Experimento 3: macho apareado versus macho no apareado + hembra receptiva

Se encontraron diferencias en el tiempo que las hembras receptivas permanecieron en los círculos entre machos apareados y no apareados, respecto de ambas señales químicas, con y sin contacto ($t_{CC}=3.52$, $p<0.01$; $t_{SC}=2.99$, $p<0.05$; Fig. 4.4a, b; respectivamente): las hembras receptivas prefirieron los machos no apareados.

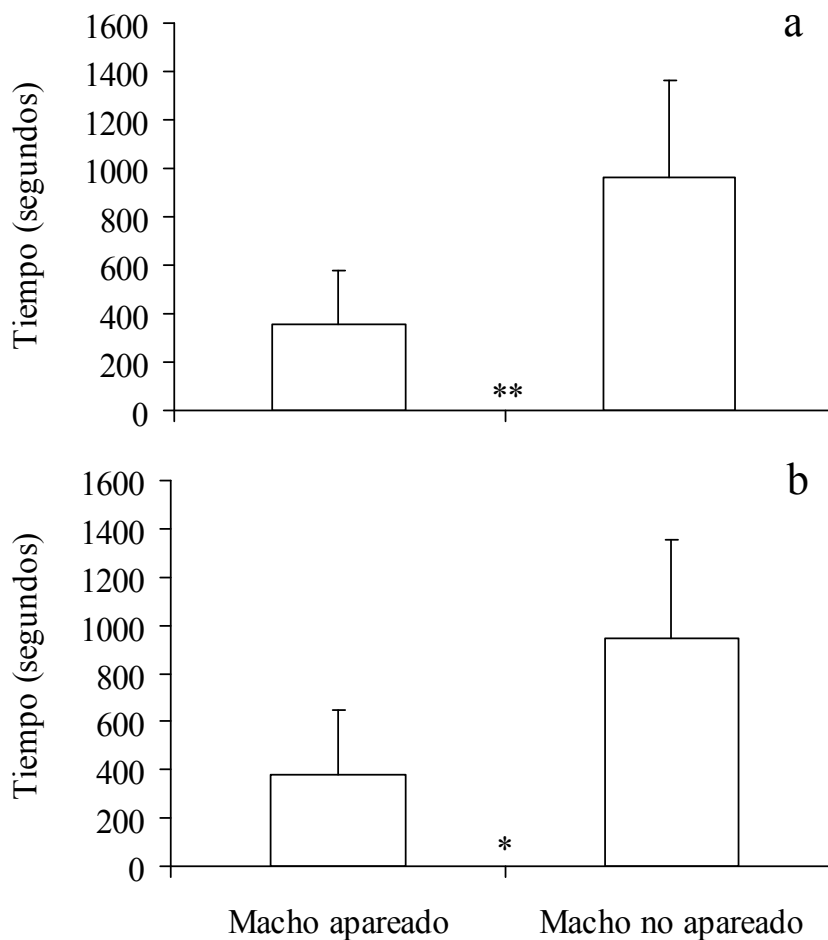


Fig. 4.4. Diseño experimental 1. Se testeó la respuesta de hembras receptivas de *Neohelice granulata* eligiendo (tiempo en segundos) machos apareados o no apareados mediante la señal: **a.** química con contacto y **b.** química sin contacto, (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Experimento 4: hembra receptiva versus hembra no receptiva + macho apareado

Respecto de los dos tipos de señales químicas, con y sin contacto, no se encontraron diferencias en el tiempo que el macho apareado permaneció en los círculos entre hembras receptivas y no receptivas ($t_{CC}=0.05$, $p=0.959$; $t_{SC}=1.18$, $p=0.27$; respectivamente).

Respuesta a la señal química con y sin contacto de las hembras receptivas

En los experimentos [1] y [3] no se encontraron diferencias significativas respecto de la respuesta de las hembras receptivas a la señal química con y sin contacto de los machos grande, ni de los machos no apareados, respectivamente ($t=1.44$, $p=0.16$; $t=0.11$, $p=0.91$; respectivamente).

Diseño experimental 2*Tratamiento 1: dos machos apareados versus un macho no apareado, un macho apareado + hembra receptiva*

Se encontraron diferencias respecto del tiempo que las hembras receptivas pasaron en los círculos que recibieron potenciales señales químicas de dos machos apareados *versus* uno no apareado y otro apareado: las hembras permanecieron más tiempo junto a los segundos ($t_{SC}=3.49$, $p<0.01$) (Fig. 4.5a).

Tratamiento 2: dos machos no apareados versus un macho apareado, un macho no apareado + hembra receptiva

No se encontraron diferencias respecto del tiempo que las hembras receptivas pasaron en los círculos que recibieron potenciales señales químicas de dos machos no apareados *versus* uno apareado y otro no apareado ($t_{SC}=0.23$, $p=0.82$) (Fig. 4.5b).

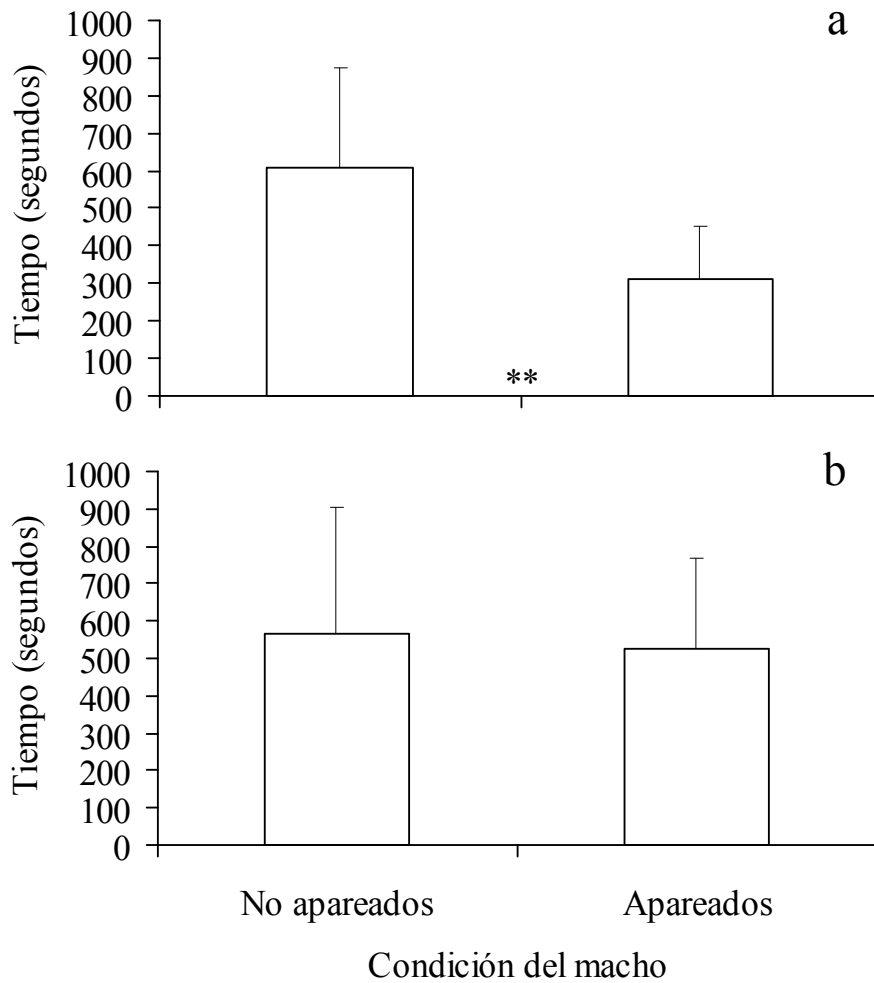


Fig. 4.5. Diseño experimental 2. Se testeó la respuesta de hembras receptoras de *Neohelice granulata* eligiendo (tiempo en segundos) machos apareados o no apareados mediante la señal química sin contacto (SC). **a.** Se utilizaron dos machos no apareados en cada contenedor adicional, + un macho no apareado + un macho apareado en cada cilindro. **b.** Se utilizaron dos machos apareados en cada contenedor adicional, + un macho apareado + un macho no apareado en cada cilindro. (** $p < 0.01$).

Respuesta de la señal química de las hembras receptoras hacia los machos no apareados entre ambos tratamientos

No se encontraron diferencias respecto de la respuesta de las hembras receptoras hacia la señal química sin contacto emitida por los machos no apareados entre ambos tratamientos: con un macho no apareado (tratamiento 1) o con tres machos no apareados (tratamiento 2) ($t=0.29$, $p=0.78$).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente capítulo demuestran que en *Neohelice granulata* la elección de la pareja es realizada por parte de las hembras, utilizando señales químicas, mediadas por contacto entre individuos, como así también sin contacto, mediante señales emitidas al agua; mientras que los machos no demostraron ninguna capacidad de elección de hembras receptivas en los distintos experimentos, utilizando tanto señales visuales como químicas. Se encontró además, que las hembras prefirieron los machos de talla grande y no apareados. Consecuentemente, se observó que los machos no apareados estarían emitiendo señales químicas para atraer a las hembras, mientras que por el contrario, los apareados no emitirían ninguna, o bien, el tipo de señal liberada no atraería a las hembras.

En relación al sexo que lleva a cabo la elección de la pareja, la elección por parte de las hembras en crustáceos fue registrada en varios trabajos, como por ejemplo, en Backwell y Passmore (1996), Sato y Goshima (2007), Iyengar y Starks (2008). Específicamente, en la langosta *Homarus americanus*, se ha sugerido que las hembras en pre o inter-muda tienen la capacidad de encontrar las cuevas de los machos de acuerdo a las señales químicas producidas por estos (Cowan y Atema 1990). En el caso del portúnido *Callinectes sapidus* una feromona liberada por los machos al agua provoca el inicio del comportamiento reproductivo de búsqueda en las hembras (Teytaud 1971; Bushmann 1999). Mientras que en el caso de la langosta *Jasus edwardsii* se sugirió que las hembras elegirían a los machos de mayores tallas utilizando una combinación de señales visuales, táctiles y químicas (Raethke et al. 2004). Un caso particular lo constituye el camarón *Rhynchocinetes typus*, en el cual se demostró que las hembras receptivas seleccionaron a los machos del morfotipo dominante (“robustos”) mediante la utilización de señales químicas, mientras que éstos seleccionaron a las hembras receptivas mediante el uso de señales visuales, es decir, que el tipo de señal involucrada en el reconocimiento de la pareja para el apareamiento fue distinta entre sexos (Díaz y Thiel 2004).

En ambos sexos, las decisiones en el apareamiento estarían basadas en la disponibilidad de las oportunidades para aparearse, la calidad de la pareja y las condiciones del medio ambiente (Thiel y Duffy 2007). Además, se establece que la forma de comunicación química mediada por feromonas sexuales requerida para llevar

a cabo dichas decisiones, variará de acuerdo con el sistema de apareamiento particular de cada especie (Bauer 2011). En *N. granulata*, la selección de machos por parte de las hembras receptivas mediante señales químicas podría explicarse de acuerdo al sistema de apareamiento descrito en el capítulo II, el cual se encuentra basado en la defensa de recursos (cuevas) por parte de los machos de mayor talla. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente capítulo, dado que los machos parecieron no elegir a las hembras utilizando las señales testeadas en los distintos experimentos, se propone que los machos grandes invertirían su energía en la construcción de cuevas aptas para el apareamiento y la cópula, las cuales serían buscadas y seleccionadas por las hembras receptivas. De esta forma, la hembra sería el sexo “de búsqueda” de pareja, por lo cual, el que detectaría las señales químicas, mientras que los machos las emitirían. Esta fuerte conexión entre la comunicación sexual entre ambos sexos y el tipo de sistema de apareamiento fue también descrita para *R. typus* (Díaz y Thiel 2004). Además, de acuerdo a los resultados mostrando que los machos no tuvieron la capacidad de reconocer a las hembras receptivas, indicaría que las mismas no emiten señales químicas que revelen su condición, posiblemente con el objetivo de evitar ser reconocidas e interceptadas por machos de menor calidad durante el proceso de búsqueda de machos con cuevas aptas para el apareamiento. Esta capacidad de las hembras de “ocultar” su condición reproductiva a los machos fue también registrada en el camarón *Palaemonetes pugio* (Bauer y Abdalla 2001).

Diversos trabajos registraron que la elección por parte de las hembras está asociada a diversos criterios independientes tales como: [1] la talla del macho y [2] el tipo de cueva, dado que las hembras prefirieron los machos de mayor talla y las cuevas de mejor calidad en *Uca annulipes* (Backwell y Passmore 1996), y [3] la condición “no apareado” de los machos respecto de los apareados evitando el riesgo de limitación espermática como en *Hapalogaster dentata* (Sato y Goshima 2007). En el mismo sentido, en este estudio, se encontró que las hembras de *N. granulata* prefirieron los machos de mayores tallas y no apareados. En relación a la talla de los machos de *N. granulata*, dado que las hembras prefirieron los de mayores tallas y debido a que éstos son los que construyen las cuevas con cámaras en las cuales ocurre la cópula (resultados obtenidos en el capítulo II), respecto de los machos de menores tallas que construyen cuevas sin cámaras, no aptas para el apareamiento, se establece que las hembras eligen al macho de acuerdo a su fenotipo (mayor talla), obteniendo beneficios directos (una

cueva con cámara en la cual el apareamiento es más seguro respecto del apareamiento en superficie donde existe un mayor riesgo de predación o una mayor probabilidad de sufrir heridas durante las interacciones agonísticas entre machos). Esta elección de los machos dominantes por parte de las hembras receptivas es común en crustáceos (e. j. Karplus et al. 2000; Diaz y Thiel 2004; Atema y Steinbach 2007). Dado que en este estudio las hembras prefirieron a los machos no apareados, se propone que las hembras de *N. granulata*, seleccionarían al macho utilizando distintos criterios. En este último caso, el criterio se encontraría basado en la capacidad que tienen los machos no apareados de transferir mayor cantidad de reservas espermáticas, evitando la limitación espermática en las hembras, y consecuentemente, favoreciendo la tasa de fecundación y el tamaño de la puesta.

Respecto de las señales utilizadas en el reconocimiento y elección de la pareja, se han realizado numerosos estudios en crustáceos e insectos que indican la importancia de las señales químicas involucradas en las interacciones de comportamiento reproductivo (e. j. McCleese et al. 1977; Dunham 1988; Diaz y Thiel 2004). En varias especies de cangrejos, el reconocimiento entre ambos sexos ocurre mediante la liberación de sustancias químicas denominadas feromonas, las cuales se han reconocido indirectamente mediante la observación de un aumento en el movimiento de las anténulas o maxilipedios, o de la locomoción (Bouchard et al. 1996; Jones y Hartnoll 1997). Para las hembras de varias especies, las señales químicas son las de mayor jerarquía dado que son las utilizadas en el reconocimiento y localización de las parejas potenciales y para determinar la calidad del macho (e. j. Bushmann y Atema 2000; Díaz y Thiel 2004). Además, algunos estudios han señalado la existencia del “señalamiento multimodal” en los crustáceos, cuando la elección del sexo opuesto se realiza mediante la utilización conjunta de señales visuales y químicas, como son los casos del camarón *Alpheus heterochaelis* (Hughes 1996) y de la langosta *Procambarus clarkii* (Aquiloni y Gherardi 2008). En el caso de *N. granulata*, se observó que las señales involucradas en la elección del macho por parte de las hembras fueron las químicas, mientras que las visuales no parecieron influenciar la elección, a pesar de ser ésta una especie semi-terrestre. Sin embargo, las señales visuales en conexión con comportamientos de cortejo elaborados, sí han sido registradas para otras especies terrestres (Salmon 1983; Burggren y McMahon 1988; Backwell et al. 1998; Pope 2000). Específicamente, en los ocapódidos han sido frecuentemente descriptas, dado que los machos se ubican cercanos

a su cueva pero en superficie, mostrando movimientos de cortejo de su quela para atraer visualmente a las hembras, los cuales serían indicadores de la calidad de la pareja (Christy 2007; Christy y Rittschof 2011 y sus referencias). Por el contrario, en *N. granulata*, los machos se encuentran principalmente dentro de sus cuevas, siendo no visibles, por lo cual, es esperable el resultado encontrado acerca de que las señales visuales no son importantes en el reconocimiento de la pareja.

Respecto de las señales químicas, en el presente capítulo, se determinó que estuvieron involucradas tanto las emitidas al agua como las mediadas por contacto, y que ambas generaron una intensidad similar en la respuesta de las hembras receptoras (tanto en la elección de los machos de mayores tallas como de los machos no apareados). Se ha sugerido que en el cangrejo *Telmessus cheiragonus*, al menos dos tipos distintos de feromonas estarían involucradas en el comportamiento de apareamiento: [1] una “hormona distante” que induciría el comportamiento de pre-cópula, y [2] otra “hormona de contacto” que induciría la cópula (Kamio et al. 2002). Estas últimas, constituirían sustancias insolubles, secretadas a través de poros distribuidos en la cutícula de las hembras, los cuales serían percibidos por los machos durante la palpación de la hembra a través de quimiorreceptores (Borowsky 1991; Caskey y Bauer 2005; Herborg et al. 2006). De forma semejante, se sugiere que en *N. granulata* actuarían estos dos tipos de señales químicas, feromonas liberadas al agua y feromonas liberadas a través de la cutícula. Sin embargo, de acuerdo al diseño experimental utilizado en el presente capítulo, no se pudo determinar si estos dos tipos de señales cumplen funciones diferentes en el comportamiento reproductivo de *N. granulata* (e. j. en la pre-cópula o cópula), como sí ha sido demostrado para *T. cheiragonus* (Kamio et al. 2002).

De acuerdo a la concentración o a la cantidad de la señal química liberada, se sugirió que la misma variaría de acuerdo a la talla del macho, lo cual serviría como indicador para la hembra (Sato y Goshima 2007). Estudios en peces demostraron que durante las interacciones agonísticas entre machos, la cantidad de feromonas liberadas en la orina está relacionada con la dominancia: machos dominantes acumulan y liberan mayor cantidad de feromonas respecto de los machos no dominantes (Barata et al. 2007). En el caso de *N. granulata*, la elección de machos de mayor talla por parte de las hembras podría indicar que la concentración de señal química liberada por ellos es mayor respecto de los machos de menor talla, o bien, que machos grandes y chicos

estarían liberando distintos tipos de señales para atraer a las hembras. Adicionalmente, respecto de la preferencia de las hembras de *N. granulata* por los machos no apareados, los resultados aquí obtenidos, demuestran que estos machos son los que emiten las señales químicas, mientras que los apareados no emitirían señal alguna, o bien, emitirían una señal la cual no sería atractiva para las hembras. De este modo, se podría sugerir que existen dos mecanismos mediante los cuales las hembras eligen a los machos de mayores tallas y no apareados: [1] la señal emitida por éstos se concentra y ejerce un efecto mayor respecto de la de los machos de menores tallas o apareados, o [2] los machos de tallas mayores y menores, y los machos no apareados y apareados, emitirían señales químicas distintas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el tratamiento 2 del diseño experimental 2 (donde se observó que las hembras no mostraron una preferencia hacia el cilindro que recibió potenciales señales químicas de dos machos no apareados, respecto del cilindro que recibió potenciales señales químicas de un único macho no apareado y otro apareado) muestran que la cantidad de señal química liberada por los machos no apareados no sería acumulativa dado que no hubo un efecto mayor debido a la presencia de dos machos no apareados *versus* uno solo, sino que, sólo la presencia de la señal indicaría atracción hacia la hembra receptiva. De esta manera, se puede sugerir que las hembras sólo detectarían la presencia de la potencial señal emitida por los machos no apareados pero no tendrían la capacidad de distinguir una concentración o cantidad de la señal. Por lo cual, se sugiere que más probablemente, los machos se encuentren emitiendo distinto tipo de señal de acuerdo a su categoría. Se necesitará realizar experimentos en el futuro que permitan dilucidar esta cuestión.

Finalmente, respecto de la fuente de liberación de la señal o el proceso fisiológico involucrado en su producción, Sato y Goshima (2007) sugirieron que la misma sería liberada en la orina y que su producción estaría asociada a la cantidad de reservas espermáticas, las cuales disminuirían al aumentar la frecuencia del apareamiento. De manera similar, si bien en este estudio no se realizaron experimentos para determinar la fuente de la señal, se podría sugerir que en *N. granulata* la fuente de liberación de la señal es la orina mientras que el tipo de señal química liberada se encontraría asociada a la cantidad de las reservas espermáticas. Se sugiere, además, que la cantidad de señal química liberada podría estar relacionada con algún mecanismo

asociado al grado de desarrollo de los espermatozoides en los testículos, o a la cantidad de espermátóforos acumulados en los vasos deferentes.

Capítulo V

Comportamiento y estrategias reproductivas de

***Neohelice granulata*: diversos factores que
afectan la cópula y el cuidado de pre y post-
cópula**

Comportamiento y estrategias reproductivas de *Neohelice granulata*: factores que afectan la cópula y el cuidado de pre y post-cópula

Introducción

Las estrategias en el comportamiento de apareamiento de los cangrejos *Brachyura* son complejas y difieren ampliamente en términos del modo de competencia entre machos por el acceso a las hembras receptivas. La competencia intra-sexual por la adquisición de la pareja es una característica fundamental de la reproducción sexual y el comportamiento reproductivo (Trivers 1972). En el caso de los machos, el objetivo es fecundar la mayor cantidad de ovocitos posibles, mientras que para las hembras, es maximizar el suministro, la diversidad y la calidad genética del esperma (van der Brink y McLay 2010). A los efectos de establecer comparaciones entre las características de las diversas estrategias reproductivas desarrolladas por los *Brachyura*, se deben considerar principalmente tres factores: [1] el tipo de crecimiento de la especie, determinado o indeterminado, [2] si el apareamiento está o no asociado al proceso de muda, y [3] la estructura del receptáculo seminal (van der Brink y McLay 2010).

En especies de cangrejos con crecimiento indeterminado como portúnidos y cáncrios, el apareamiento está asociado a la muda, los machos defienden a las hembras en el momento previo ésta (Hartnoll 1969), y la cópula es posible solamente durante un tiempo limitado cuando las hembras se encuentran receptivas, en la condición “blandas” (Salmon 1983). En otras especies como los varúnidos y majoideos, la actividad reproductiva no está ligada a la muda y el apareamiento ocurre en inter-muda, durante la condición “hembra dura” (Hartnoll 1969; Diesel 1991). En este último caso, de acuerdo a las diferentes especies, las hembras pueden estar receptivas durante todo el ciclo reproductivo, o bien, el período de receptividad puede estar limitado a un tiempo determinado, como por ejemplo en las hembras que descalcifican el opérculo de la vulva. Dependiendo de cuál de los dos tipos de apareamiento presente la especie, los comportamientos reproductivos serán diferentes.

El comportamiento reproductivo de los machos además depende de la competencia espermática (definida en el capítulo I). En relación a esto, la forma de conexión entre la vagina y el ovario al receptáculo seminal tiene importantes implicancias en la paternidad de la progenie. Diesel (1991) dividió el receptáculo seminal de las hembras *Brachyura* en dos tipos morfológicos: dorsal y ventral (descritos en detalle en el capítulo I). En el primero, el primer macho en copular a la hembra es quien se asegura la fecundación de la mayor parte de los ovocitos, mientras que en el segundo, es el último macho en copular. Consecuentemente, los machos de diversas especies desarrollan una variedad de comportamientos reproductivos para favorecer la paternidad de la progenie y evitar que otros machos copulen a las hembras receptivas hasta que ocurra la fecundación de los ovocitos.

Respecto del sistema de apareamiento y las distintas estrategias utilizadas en el desarrollo de los comportamientos reproductivos exitosos, un debate actual promueve indagar acerca de la medida en la cual el conflicto de intereses entre sexos afecta el comportamiento durante los distintos tipos de interacciones entre machos y hembras (e. j. comportamiento de búsqueda de la pareja, cortejo, cópula, transferencia de espermia, re-apareamiento, los cuidados pre y post-copulatorios, etc). Entre estas interacciones, el cuidado de la pareja es un comportamiento ampliamente distribuido en los distintos taxa, sugiriendo una importante función en el éxito de apareamiento de los machos (Ridley 1983; Smith 1984). Estos comportamientos son realizados por los machos para competir por el acceso a las hembras así como para evitar la competencia espermática (Grafen y Ridley 1983; Smith 1984). El beneficio obvio del cuidado de la hembra es la monopolización de la pareja cuando la probabilidad de encontrar una hembra receptiva es baja (Parker 1970). A su vez, la probabilidad de encontrar una hembra receptiva depende de la relación operacional de sexos (ROS, definida en el capítulo I) (Parker 1974).

Los comportamientos de cuidado pre y post-copulatorios son flexibles y se encuentran influenciados por el contexto socio-sexual (Rondeau y Sainte-Marie 2001; Sainte-Marie et al. 2008). Estos comportamientos son comunes en los crustáceos y permiten que los machos cuiden hembras en el momento previo y durante el período de receptividad de las mismas (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983). El comportamiento pre-copulatorio ocurre frecuentemente en especies en las cuales las hembras

permanecen receptivas durante un período de tiempo limitado. Algunos autores han indicado que este comportamiento de pre-cópula se ha desarrollado para monopolizar a la hembra en el período previo a que se vuelva receptiva, y consecuentemente, permitir que el macho tenga acceso y asegure la cópula con la misma (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983; Jivoff 1997a). La sincronía en el período de receptividad de las hembras en una población, también modifica el tiempo de cuidado óptimo (Yamamura y Jormalainen 1996).

En el caso de los comportamientos post-copulatorios, los mismos previenen a los machos rivales de aparearse con las hembras inseminadas, por lo cual, aseguran que su espermia fecunde los ovocitos de la hembra (Parker 1970). Los machos deberían variar el patrón de cuidado de la pareja en relación con la competencia y la maximización del número de ovocitos fecundados durante la estación reproductiva, evaluando costos y beneficios respecto del tiempo invertido en el cuidado de la pareja *versus* el tiempo invertido en la búsqueda de nuevas parejas (Parker 1974; Christy 1987). Además, otros factores como la disponibilidad de recursos y el riesgo de depredación podrían afectar el comportamiento de cuidado de las hembras (Dill 1978; Sih 1993; Koga et al. 1998). Las condiciones sociales variables incluyendo la proporción sexual, la tasa de encuentro de las parejas potenciales, el número de competidores potenciales, la talla de los mismos y la relativa habilidad en competir por la pareja, afectarían la decisión del macho respecto del momento del comienzo del cuidado de la hembra (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983; Yamamura 1987; Elwood y Neil 1992; Chapman y Kramer 1996).

Las estrategias reproductivas de los cangrejos Grapsoidea probablemente se encuentren además, influenciadas por el tiempo y duración de la receptividad de las hembras, la competencia intra-sexual entre machos relacionada con la talla de los mismos y el hábitat ocupado (Brockerhoff y McLay 2005c). Respecto de los dos primeros factores, el tiempo y la duración de la receptividad de las hembras determinan la ROS y pueden influenciar la intensidad de la competencia intra-sexual entre machos.

Respecto del factor “tiempo y duración de la receptividad de las hembras”, en muchas especies las hembras cuidan a la progenie y son sólo receptivas durante periodos de corta duración y de baja frecuencia, por lo cual presentan una tasa de reproducción potencial menor que la de los machos (Rondeau y Sainte-Marie 2001). Esto causa que la ROS se encuentre frecuentemente desviada en favor de los machos,

tendencia que es exacerbada cuando las hembras se vuelven receptivas en forma asincrónica. Específicamente, en especies en las cuales las hembras presentan en su vulva un opérculo calcificado que sólo se vuelve móvil mediante su descalcificación durante determinados períodos limitados (Hartnoll 1969; Henmi y Murai 1999), la ROS sesgada hacia los machos es alta durante todo el período reproductivo, por lo cual, debe considerarse como un importante factor determinado el comportamiento y las estrategias reproductivas (Jennings et al. 2000). Como resultado, la competencia sexual es más intensa entre machos que entre hembras, por lo cual, los machos exhiben comportamientos reproductivos flexibles para maximizar las estrategias de cuidado de la hembra y del suministro de esperma en el receptáculo seminal aumentando su éxito reproductivo (Trivers 1972; Ridley 1983; Clutton-Brock y Parker 1992).

Estudios basados en la competencia intra-sexual entre machos han demostrado que la talla de los mismos es frecuentemente el factor principal que determina el éxito reproductivo (e. j. Abele et al. 1986; Donalson y Adams 1989; Moriyasu y Comeau 1996; Jivoff 1997a, Sainte-Marie et al. 1999; Kamio et al. 2003). Generalmente, los machos de tallas mayores dominan a los de tallas menores durante las interacciones agonísticas por el acceso a las hembras (Stein 1976; Ridley y Thompson 1979; Ward 1983; Berrill y Arsenault 1984), dado que obtienen más fácilmente el control físico de las mismas (Berrill y Arsenault 1982; Carvacho 1989; Snedden 1990; Lee y Seed 1992). Como resultado, los machos de mayores tallas presentan, generalmente, mayores tasas de fecundación, dado que, además, pueden tener acceso y asegurar a las hembras de mayores tallas las cuales presentan mayor fecundidad (Stein 1976; Ridley y Thompson 1985; Forbes et al. 1992; Stevens et al. 1993).

Respecto del factor “hábitat ocupado y sus características”, en estudios realizados en ocapódidos se ha demostrado que las cuevas de los machos presentan una cámara ensanchada terminal donde ocurre el apareamiento (Christy 2007 y sus referencias). Además, la forma de la cueva tendría un efecto sobre la elección de machos por parte de las hembras (Backwell y Passmore 1996; deRivera 2005). Por el contrario, en cangrejos grapsóideos pocos estudios han registrado que el apareamiento ocurre tanto en superficie como en el interior de las cuevas (Seiple y Salmon 1982; Bockerhoff y MacLay 2005c). Sin embargo, en el capítulo II de la presente tesis se demostró que el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata* se encuentra basado

en la defensa de recursos, cuevas, las cuales presentan una cámara en la cual ocurre el apareamiento y son construidas por los machos de mayores tallas. Además, se encontró que la forma de la cueva varió entre las áreas de estudio. Consecuentemente, los comportamientos reproductivos deberían estar influenciados por la presencia y forma de las cuevas en relación al tipo de hábitat ocupado.

El comportamiento reproductivo de los Varunidae ha sido caracterizado en pocos estudios. Hartnoll (1969) realizó una breve revisión en la cual se estableció que si bien el cortejo no existe o es breve, las hembras receptivas son muy activas y rápidamente inician la cópula (ver Hartnoll 1969 y sus referencias). En especies del género *Hemigrapsus*, se ha descrito que no existe un comportamiento de cuidado de pre-cópula, que el cortejo es corto y que la cópula es iniciada por los machos (Brockerhoff y McLay 2005c). El desarrollo de un comportamiento post-copulatorio exitoso sólo fue descrito para *Hemigrapsus crenulatus* y *H. sexdentatus*, aunque algunos autores consideran que esto se debería a la escasez de estudios realizados en especies de la familia, y no a la ausencia de dicho comportamiento, dado que este debería constituir una estrategia común que aseguraría la paternidad de la progenie debido al tipo de receptáculo seminal ventral descrito para la familia (Brockerhoff y McLay 2005c).

Hipótesis

De acuerdo a lo expuesto, se establece como hipótesis general que el comportamiento reproductivo de *Neohelice granulata* es similar a lo descrito para otras especies de Grapsoidea aunque existen variaciones entre áreas de estudio. Como hipótesis derivadas se establece que en *N. granulata*

[1] no existe un comportamiento de cuidado de la hembra pre-copulatorio,

[2] el tiempo de cópula varía de acuerdo a diversos factores como la presencia de cuevas, la talla del macho, una ROS sesgada a favor de los machos o la presencia de hembras que copulan por segunda vez, y

[3] existe un cuidado de la hembra post-copulatorio el cual varía de acuerdo a diversos factores como la presencia de cuevas, una ROS sesgada en favor de los machos, la talla del macho o la duración de la receptividad de la hembra.

Objetivos

En este contexto, el objetivo general del presente capítulo fue estudiar el comportamiento reproductivo de *N. granulata*. Como objetivos específicos se planteó:

[1] estudiar la posible existencia de un comportamiento de cuidado pre-copulatorio,

[2] describir el comportamiento de cópula y estudiar diversos factores que puedan influenciar el tiempo de cópula como la presencia de cuevas, la talla del macho, una ROS sesgada a favor de los machos, y la presencia de hembras que copulan por segunda vez, y

[3] estudiar la existencia de un comportamiento de cuidado post-copulatorio y los posibles factores que lo podrían influenciar como la presencia de cuevas, una ROS sesgada en favor de los machos, la talla del macho o la duración de la receptividad de la hembra.

Materiales y métodos

Experimentos de comportamiento de cuidado pre-copulatorio en individuos de LMC en campo

En la Laguna de Mar Chiquita, durante la estación reproductiva 2010/2011 se colocaron canastas plásticas (19 x 28 x 15 cm) de 1 cm² de tamaño de malla en el área intermareal, las cuales fueron enterradas en el sedimento a una profundidad de 18 cm sobre la línea divisoria entre la planicie desnuda y la planicie con espartillar, de modo que durante la marea alta se cubrieran con agua. Las canastas se taparon con la misma malla plástica. Sobre las tapas se colocaron macollos de *Spartina* con el objetivo de evitar las temperaturas elevadas (Fig. 5.1a). Las canastas fueron rellenas con sedimento del ambiente, a un nivel de 15 cm (Fig. 5.1b).



Fig. 5.1. Canastas de exclusión colocadas en la Laguna Mar Chiquita para evaluar la existencia del comportamiento y tiempo de pre-cópula de *Neohelice granulata*. **a.** canasta cubierta con *Spartina* para evitar las altas temperaturas. **b.** canasta destapada mostrando las cuevas construidas por los individuos (flechas).

Se realizaron dos tratamientos (T) los cuales consistieron en colocar:

[T1] una hembra no receptiva (ancho de caparazón (AC) $>$ 24.5 mm) no ovígera y un macho grande (AC $>$ 27.5 mm), y

[T2] dos hembras no receptivas no ovígeras.

Las hembras seleccionadas se caracterizaron por presentar una membrana opercular en su vulva de color transparente dado que esta condición indicaría que las mismas se encontrarían más cercanas al período de descalcificación y receptividad (obs. pers.). En cada tratamiento, los dos individuos fueron marcados con esmalte de diferente color formando una mancha circular sobre el caparazón.

Cada canasta de exclusión se controló diariamente y la marca se reforzó cada dos días. El registro consistió en determinar si los individuos construían cuevas, la posición de las cuevas y si éstas eran mantenidas por sus mismos dueños durante todo el período de duración del experimento. Se registró además, el momento en que la hembra se volviera receptiva mediante la inspección de la movilidad de la vulva. La duración del experimento se extendió desde el momento en que los individuos fueron colocados en la canasta de exclusión, hasta la detección de una hembra receptiva. Al reconocer la hembra receptiva, se registró la posición en que se encontraba: en superficie, en su cueva, en la cueva del macho [T1], o en la cueva de la otra hembra [T2]. En el caso de encontrarse una hembra no receptiva dentro de la cueva del macho y que posteriormente la misma se volviera receptiva, se lo consideró como un comportamiento de cuidado de

pre-cópula exitoso y se registró el tiempo desde que se la encontró no receptiva en la cueva del macho hasta que estuvo receptiva.

Se realizó un test de G de independencia considerando como hipótesis nula la independencia entre el número de hembras receptivas encontradas en superficie, en su cueva o en la otra cueva y el tratamiento. En caso de encontrarse diferencias entre tratamientos, se realizaron tests Z de comparación de proporciones para testear diferencias para cada lugar en el cual se encontró a la hembra receptiva entre ambos tratamientos. Se realizaron 15 réplicas por tratamiento.

Experimentos de comportamiento de cópula y cuidado post-copulatorio en laboratorio

Se trabajó durante las estaciones reproductivas de 2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012 con individuos de la Laguna de Mar Chiquita (LMC) y de San Antonio Oeste (SAO). Los individuos maduros (>19 mm AC) se colectaron del campo y se transportaron vivos al laboratorio. Allí, se acondicionaron en acuarios aireados con agua de mar (0.3x0.35x0.25 m, 3 cm de altura de agua de mar), y se mantuvieron bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (23°C-27°C). Para la realización de los experimentos, se utilizaron acuarios plásticos aireados (0.4x0.5x0.2 m) en los cuales se colocaron 20 y 10 cm de sedimento obtenido de LMC y SAO, respectivamente, el cual fue colocado en uno de los extremos del acuario (suficiente cantidad que permitió la construcción de cuevas), mientras que en el otro extremo se colocó una roca (de aproximadamente 10x20x6 cm) de modo de actuar como refugio alternativo (Fig. 5.2). Para la construcción de las cuevas se utilizaron machos grandes, los cuales se colocaron 1-3 días antes para que construyeran la cueva. Todas las cuevas construidas en laboratorio presentaron un ensanchamiento a modo de cámara en la parte superior de la cueva, dado que la menor cantidad de sedimento respecto del área natural no permitió la construcción de cuevas profundas con cámaras en su parte media (ver resultados capítulo II). En los experimentos en los cuales no se requirieron cuevas, se utilizó un nivel de 2 cm de sedimento correspondiente a ambas áreas de estudio, más el refugio alternativo. Se utilizó un nivel de agua de mar de 3 cm.



Fig. 5.2. Acuarios plásticos de experimentación utilizados en los experimentos de cópula y post-cópula de *Neohelice granulata*. Se observa sedimento para permitir la construcción de cuevas; y una roca en el extremo opuesto como refugio alternativo. En este caso particular se observan dos machos dentro de sus cuevas (flechas blancas) y a la hembra receptiva en la roca (flecha negra).

Para testear el comportamiento de cópula se diseñó un experimento en el cual se consideraron cuatro tratamientos colocando en cada uno:

[T1] un macho chico (MC) (LMC: 20.7-26.3 mm AC, SAO: 21.4-26 mm AC) + una hembra receptiva *versus* un macho grande (MG) (LMC: 27.8-33.6 mm AC, SAO: 27-31.6 mm AC) + una hembra receptiva (tratamiento considerado como control) (LMC: N=20, SAO: N=15),

[T2] un macho en una cueva + una hembra receptiva *versus* un macho sin cueva + una hembra receptiva (tratamiento que testeó el tiempo de cópula en presencia de cuevas) (LMC y SAO: N=10),

[T3] 4 machos de igual talla + una hembra receptiva (tratamiento que testeó el tiempo de cópula cuando la ROS estuvo sesgada a favor de los machos) (LMC: N=13, SAO: N=12), y

[T4] un macho + una hembra receptiva la cual había copulado recientemente con otro macho (tratamiento que testeó el tiempo de cópula de hembras copuladas por otro macho por segunda vez) (LMC y SAO: N=10).

Se registró el tiempo de cópula en cada tratamiento y se describió el comportamiento de cópula. En los T1 y T2 se realizaron dos ANOVAs de dos vías para testear el efecto de los factores independientes “área de estudio”, “talla del macho” (T1); y “área de estudio” y “presencia de cuevas” (T2); sobre la variable dependiente “tiempo de cópula”. Adicionalmente, en los T3 y T4, se realizaron dos ANOVAs de dos vías para evaluar el efecto de los factores independientes “área de estudio” y “ROS sesgada” (T3); y “área de estudio” y “hembras que copularon por segunda vez” (T4); respecto de la variable dependiente “tiempo de cópula”. En estos dos últimos tratamientos, se consideró al tiempo de cópula de los machos del T1 (MG+MC, ver resultados del presente capítulo) como el control, es decir, en el T3 como el tiempo de cópula cuando la ROS fue 1:1, y en el T4 como el tiempo de cópula de hembras que copularon por primera vez.

Experimentos de comportamiento de cuidado post-copulatorio en individuos de LMC en laboratorio

En el caso de LMC, de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos de campo descritos en el capítulo II, se concluyó que el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata* está basado en la defensa de las cuevas (recursos) con cámaras construidas por los MG, en las que ocurriría la cópula y se favorecería el desarrollo de un comportamiento de cuidado de la hembra post-copulatorio exitoso. Sin embargo, tanto MG como MC se encontraron en cuevas con cámaras (resultados capítulo II). De acuerdo a esto, se utilizaron MG para que construyeran las cuevas de experimentación, los cuales se colocaron 1-3 días antes del comienzo del experimento (aunque, de acuerdo al experimento, si se requirió un MC en una cueva construida por un MG, este último fue extraído luego de la construcción de su cueva, y se añadió un MC). Todas las cuevas construidas en laboratorio presentaron un ensanchamiento a modo de cámara en la parte superior de la cueva, dado que la menor cantidad de sedimento respecto del área natural no permitió la construcción de cuevas profundas con cámaras en su parte media. En los experimentos, se consideró a la “presencia o ausencia de cuevas” como el factor principal, mientras que los factores alternativos fueron: “ROS desviada a favor de los machos”, “duración de la receptividad de la hembra” y “talla del macho”.

Para testear el efecto del factor “presencia *versus* la ausencia de cuevas” en laboratorio se diseñó un experimento con dos tratamientos:

[T1] un MG en una cueva + una hembra receptiva, y

[T2] un MG sin cueva + una hembra receptiva.

Se realizaron 15 réplicas por tratamiento. Se realizó un test de Chi-cuadrado para testear diferencias en la frecuencia de cuidado post-copulatorio entre tratamientos.

Para testear el efecto del factor “ROS sesgada en favor de los machos” se colocó a los individuos en cuatro condiciones: [1] una pareja en post-cópula dentro de una cueva + tres machos adicionales de igual talla respecto del macho en post-cópula (N=15), [2] una pareja en post-cópula sin cueva + tres machos adicionales de igual talla respecto del macho sin cueva (N=12), [3] una pareja en post-cópula dentro de una cueva (N=15), y [4] una pareja en post-cópula sin cueva (N=12). Las condiciones [1] y [2] fueron consideradas como el **tratamiento 1 [T1]** (ROS sesgada en favor de los machos en presencia o ausencia de cuevas), mientras que las condiciones [3] y [4] fueron consideradas como el **tratamiento 2 [T2]** (ROS 1:1 en presencia o ausencia de cuevas). Los machos adicionales fueron marcados con una mancha circular en el caparazón dorsal realizada con esmalte de color y agregados inmediatamente con posterioridad a la finalización de la cópula. El experimento se prolongó desde la finalización de la cópula hasta el desove de la hembra, en los casos en los que permaneció con el macho que la había copulado inicialmente; o hasta que la hembra se encontró sola o con alguno de los machos alternativos, en cópula o siendo cuidada por este (agarrada por sus quelas o colocada debajo del macho, encerrada entre sus patas). Un cuidado de post-cópula fue considerado exitoso cuando la hembra permaneció con el primer macho que la copuló en su cueva o fuera de está pero sostenida por él, hasta el desove. Los acuarios se registraron diariamente.

Para testear el efecto del factor “duración de la receptividad de la hembra (corta o extendida)”, se colocó a los individuos en cuatro condiciones: [1] un macho en una cueva + una hembra receptiva cuya receptividad fue considerada corta (3-5 días), [2] un macho sin cueva + una hembra receptiva cuya receptividad fue considerada corta (3-5 días), [3] un macho en una cueva + una hembra receptiva cuya receptividad fue considerada extendida (7-9 días), y [4] un macho sin cueva + una hembra receptiva cuya receptividad fue considerada extendida (7-9 días). Las condiciones [1] y [2] fueron

consideradas como el **tratamiento 1 [T1]** (hembras de receptividad corta en presencia o ausencia de cuevas), mientras que las condiciones [3] y [4] fueron consideradas como el **tratamiento 2 [T2]** (hembras de receptividad extendida en presencia o ausencia de cuevas). Las hembras receptivas se utilizaron en el experimento el primer día que se inició el período receptivo (cuando ocurrió la cópula), y luego, de acuerdo a su duración hasta el desove, se las consideró de receptividad corta u extendida (ver resultados capítulo III). Se obtuvieron 10 réplicas por tratamiento.

Para testear el efecto del factor “talla del macho”: MG (AC>28 mm) o MC (AC<27 mm), se colocó a los individuos en cuatro condiciones: [1] un MG en una cueva + una hembra receptiva, [2] un MG sin cueva + una hembra receptiva, [3] un MC en una cueva + una hembra receptiva, y [4] un MC sin cueva + una hembra receptiva. Las condiciones [1] y [2] fueron consideradas como el **tratamiento 1 [T1]** (MG en presencia o ausencia de cuevas), mientras que las condiciones [3] y [4] fueron consideradas como el **tratamiento 2 [T2]** (MC en presencia o ausencia de cuevas). Se obtuvieron 12 réplicas por tratamiento.

Para el análisis del efecto de los factores “ROS sesgada”, “duración de la receptividad de la hembra” y “talla del macho”, se realizaron tests de Chi-cuadrado para testear diferencias entre tratamientos, y posteriormente, se realizó un test Z de comparación de proporciones para testear diferencias dentro de cada tratamiento, entre ambas condiciones descriptas. En los dos últimos experimentos (efecto de la duración de la receptividad de hembras y de la talla del macho), el experimento se prolongó desde la finalización de la cópula hasta el desove de la hembra o hasta que la hembra se encontró fuera de la cueva del macho y sin contacto con este. Un cuidado de post-cópula fue considerado exitoso cuando la hembra permaneció con el macho que la copuló, en su cueva o fuera de esta, pero sostenida por él, hasta el desove. Los acuarios se registraron diariamente.

Experimentos de cuidado post-copulatorio en individuos de SAO en laboratorio

En SAO, de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo II, se encontró que el comportamiento de cuidado post-cópula en campo no fue exitoso, en presencia o ausencia de cuevas con entradas (cámaras) ensanchadas. Consecuentemente, en los experimentos diseñados a continuación, a diferencia de los diseñados para los

individuos de LMC, no se consideró a la presencia o ausencia de cuevas como el factor principal, sino como uno adicional. Se diseñaron cuatro experimentos, con dos tratamientos cada uno:

[E1] un acuario plástico con sedimento (10 cm) al cual se le agregó un MG que se dejó entre 1-2 días para que construyera una cueva + una hembra receptiva *versus* un acuario con 1 cm de sedimento + un MG + una hembra receptiva,

[E2] una pareja en post-cópula *versus* una pareja en post-cópula + tres machos adicionales de igual talla que el macho en post-cópula,

[E3] un macho + una hembra de receptividad corta (1-3 días) *versus* un macho + una hembra de receptividad extendida (5-6 días), y

[E4] un MG ($AC > 27.4$ mm) + una hembra receptiva *versus* un MC ($AC < 25.9$ mm) + una hembra receptiva.

Los machos adicionales se marcaron con una mancha circular sobre el caparazón dorsal realizada con esmalte de color. Las hembras receptivas se utilizaron en el experimento el primer día que se inició el período receptivo (cuando ocurrió la cópula), y luego, de acuerdo a su duración hasta el desove, se las consideró de receptividad corta u extendida (ver resultados capítulo III). En los cuatro experimentos se registró si existió un cuidado post-copulatorio exitoso (la hembra se mantuvo dentro de la cueva o en contacto con el macho que la copuló, cada vez que el experimento se registró diariamente, hasta el desove). Todos los experimentos comenzaron inmediatamente al finalizar la cópula y finalizaron al encontrar la hembra desovada o sin contacto con el macho que la copuló o en contacto con algún macho adicional [E2]. En los cuatro experimentos se realizó un test de Chi-cuadrado para testear diferencias entre ambos tratamientos.

Experimentos de actividad de hembras de LMC en laboratorio

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento donde se testeó el efecto de la duración de la receptividad de las hembras sobre el desarrollo de un comportamiento exitoso de cuidado post-copulatorio de la hembra, se diseñó un segundo experimento en el cual se midió la actividad de las hembras de receptividad corta *versus* las de receptividad larga *versus* las ovígeras. En los acuarios plásticos con sedimento en un extremo (20 cm) y refugio alternativo en el otro, se colocaron dos MG

de modo que construyeran sus cuevas. Posteriormente, se agregó una hembra de cada categoría por vez según el tratamiento:

- [T1] hembra de receptividad corta,
- [T2] hembra de receptividad extendida, y
- [T3] hembra ovígera.

Se cuantificó el tiempo de actividad ambulatoria en segundos de las hembras, es decir, el tiempo en el cual se las observó desplazándose por el acuario (se consideró como desplazamiento un traslado mínimo de 1 cm). Se describió el comportamiento observado. La duración del experimento fue de 30 minutos, comenzando con la introducción de la hembra en el acuario luego de 5 minutos de aclimatación. Se realizaron 10 réplicas por tratamiento. Se realizó un ANOVA para evaluar diferencias en el tiempo de actividad entre los tres tratamientos. En caso de encontrarse diferencias se realizó posteriormente un test de Tukey para identificar los tratamientos que difirieron entre sí.

Resultados

Experimentos de comportamiento de cuidado pre-copulatorio en individuos de LMC en campo

En ambos tratamientos, ambos cangrejos construyeron cuevas independientes. Las cuevas de los machos presentaron una cámara en la parte superior. Cada vez que se controló la posición de los individuos, cada uno se encontró en su cueva. Rara vez se encontró al macho o a las hembras no receptivas fuera de sus cuevas. En el T1, las hembras no receptivas fueron encontradas entre 20 y 26 hs (20.8 ± 3.4) antes de volverse receptivas, en la cueva de los machos, mientras que en el T2 las hembras no receptivas se encontraron en sus cuevas en el período previo a volverse receptivas (aproximadamente un día antes). Cuando las hembras se observaron receptivas, la posición en la cual se encontraron dependió del tratamiento ($G=13.61$, $p<0.01$) (Fig. 5.3). Existieron diferencias entre tratamientos respecto de la cantidad de hembras receptivas encontradas en superficie (20% *versus* 73.3% para T1 y T2 respectivamente, $Z=2.56$, $p<0.05$), y en la otra cueva (66.7% *versus* 6.7% para T1 y T2 respectivamente,

$Z=3.03$, $p<0.01$), mientras que no se encontraron diferencias respecto de las hembras encontradas en su cueva (13.3% *versus* 20% para T1 y T2 respectivamente, $Z=0.002$, $p=0.99$).

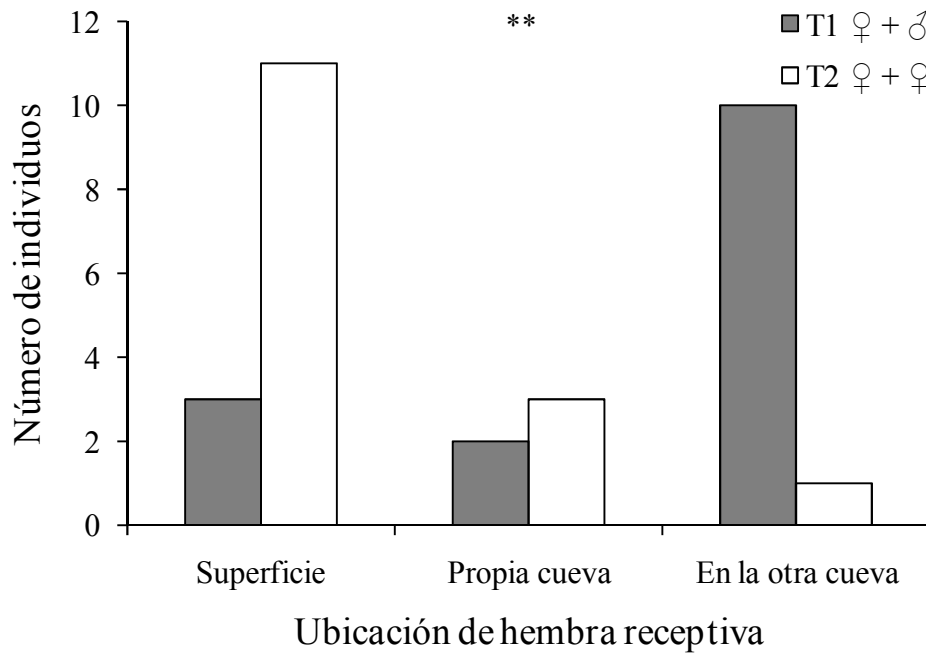


Fig. 5.3. Número de hembras receptoras de *Neohelice granulata* encontradas en superficie, en su propia cueva y en la otra cueva, cuando convivió con otra hembra (tratamiento 1, T1) y con otro macho (tratamiento 2, T2). (** $p<0.01$).

Experimentos de comportamiento de cópula en individuos de LMC y SAO en laboratorio

Los MG y MC presentaron un mismo comportamiento de cópula, el cual fue similar entre áreas de estudio. El mismo consistió en que el macho tomó a la hembra por sus quelas o patas, y sosteniéndola con sus quelas la colocó en la posición esterno con esterno (Fig. 5.4a, b). Posteriormente el macho abrió su pleon y el de la hembra e insertó sus gonopodos en la vulva. Durante, aproximadamente, los primeros 15 min de cópula, el macho sostuvo a la hembra en la posición descrita agarrándola con sus quelas por los pedúnculos oculares (Fig. 5.4b). Luego, durante aproximadamente los siguientes 15 min, el macho abrió una de sus quelas, y permaneció sosteniendo a la

hembra sólo con una quela, tomándola por su pedúnculo ocular (Fig. 5.4c). Finalmente, durante aproximadamente los siguientes 15 min, el macho soltó ambas quelas (Fig. 5.4d) hasta la finalización de la cópula, donde ambos individuos se separaron bruscamente e, inmediatamente, el macho tomó a la hembra por sus quelas o patas o bien la colocó debajo de él, entre sus patas (Fig. 5.4e, f).

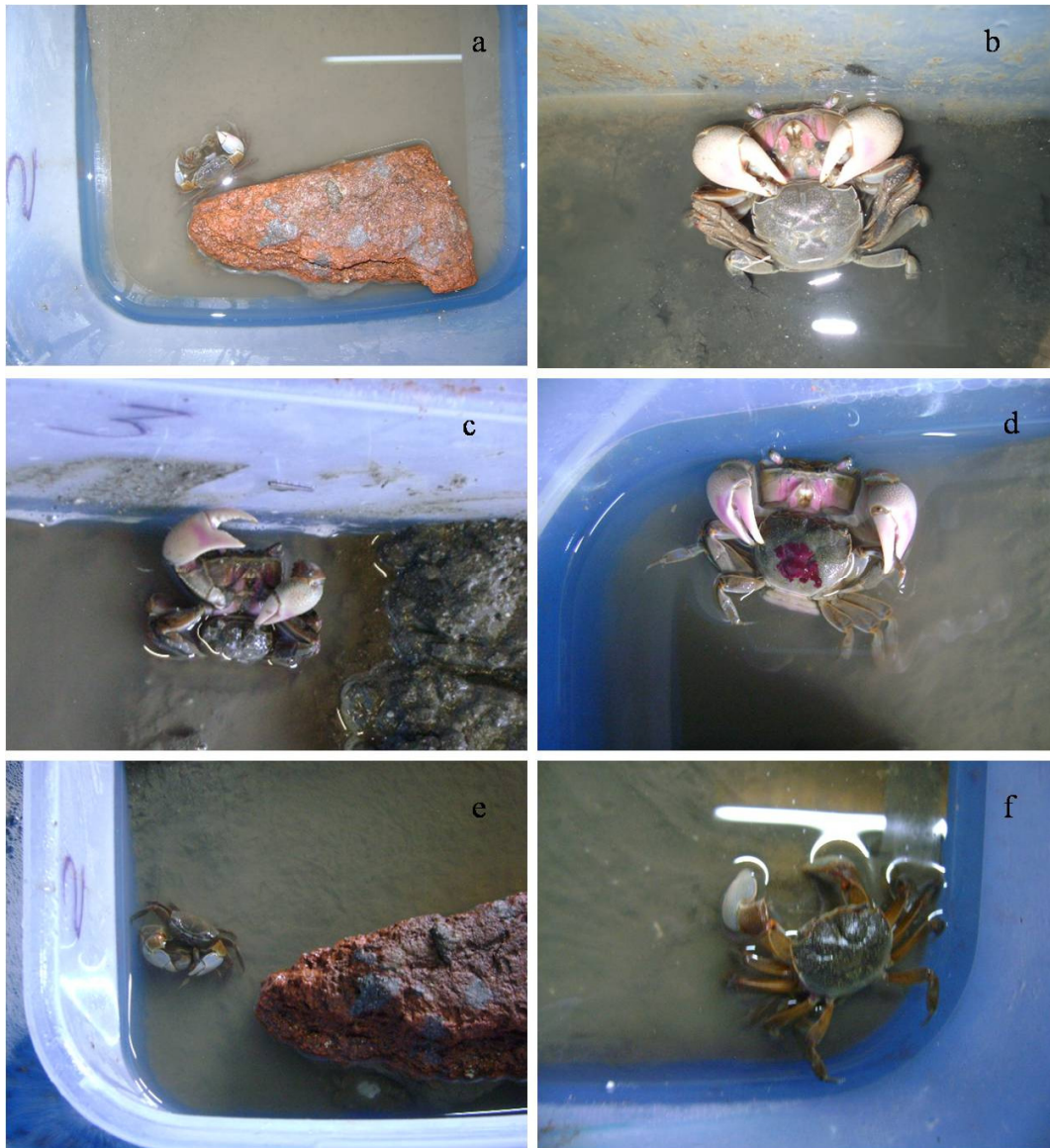


Fig. 5.4. Comportamiento de cópula de *Neohelice granulata*. **a.** macho sosteniendo a la hembra por sus patas con sus quelas en el momento previo a la cópula. **b.** macho durante la cópula, en la posición esterno con esterno, sosteniendo a la hembra con sus quelas por sus pedúnculos oculares. **c.** macho durante la cópula, donde se observa que sostiene a la hembra sólo con una de sus quelas por uno de los pedúnculos oculares. **d.** macho que liberó sus dos quelas y sólo sostiene a la hembra en la posición esterno-esterno a través de la inserción de sus gonopodos. **e.** macho en post-cópula tomando a la hembra con sus quelas. **f.** macho en post-cópula colocado sobre la hembra.

En el T1, el tiempo de cópula fue independiente de la talla del macho, grande o chico ($F=0.06$, $p=0.81$). Sin embargo, el tiempo de cópula varió entre áreas de estudio ($F=0.38$, $p<0.05$), siendo mayor en LMC respecto de SAO (LMC: 47.9 ± 15.9 , SAO: 40.9 ± 11.7) (Fig. 5.5). No se encontró una interacción entre la talla del macho y el área de estudio ($F=0.38$, $p=0.54$).

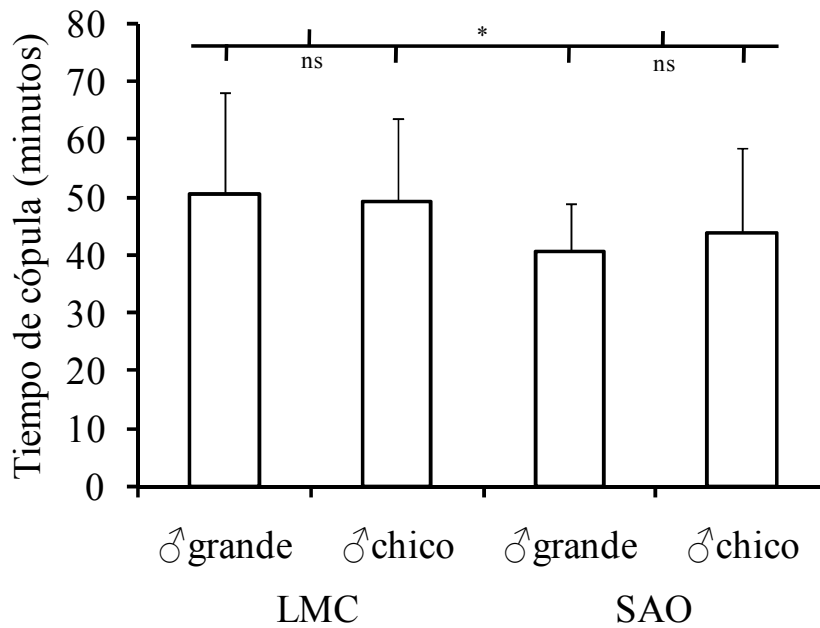


Fig. 5.5. Tiempo de cópula en minutos de los individuos de *Neohelice granulata*: machos de talla grande *versus* de talla chica que copularon en ambas áreas de estudio, Laguna Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). (* $p<0.05$; ns, diferencias no significativas).

De forma similar, en el T2, el tiempo de cópula fue independiente de la presencia o ausencia cuevas ($F=0.54$, $p=0.47$). Sin embargo, el tiempo de cópula varió entre áreas de estudio ($F=4.97$, $p<0.05$), siendo mayor en LMC respecto de SAO (LMC: 48.0 ± 13.2 , SAO: 41.2 ± 6.9) (Fig. 5.6). No se encontró una interacción entre la presencia de cuevas y el área de estudio ($F=0.08$ $p=0.77$).

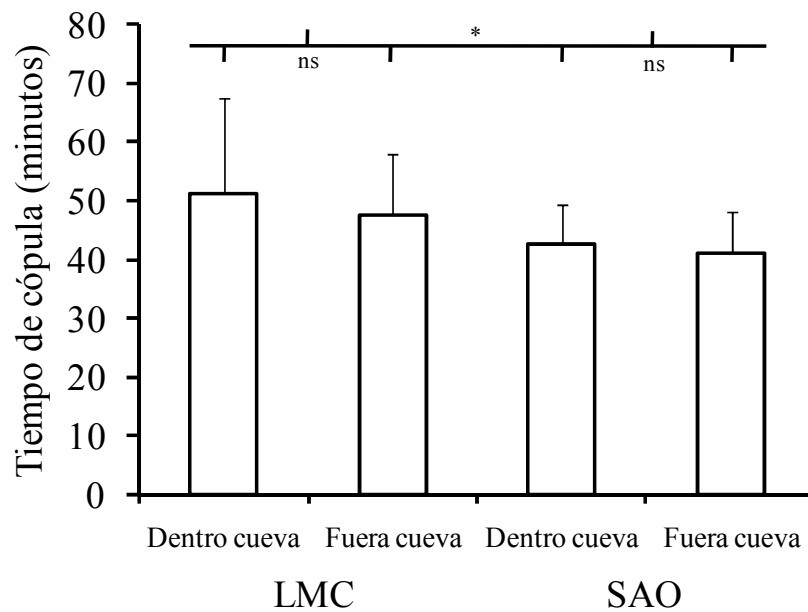


Fig. 5.6. Tiempo de cópula en minutos de los individuos de *Neohelice granulata* que copularon dentro *versus* fuera de las cuevas en ambas áreas de estudio, Laguna Mar Chiquita (LMC) y San Antonio Oeste (SAO). (* $p < 0.05$; ns, diferencias no significativas).

En el T3, existieron diferencias en el tiempo de cópula entre las hembras que copularon con un macho en ausencia de otros machos *versus* el de las hembras que copularon con un macho cuando la ROS estuvo sesgada en favor de ellos en ambas áreas de estudio ($F=74.1$, $p < 0.001$): el tiempo de cópula con una ROS 1:1 (47.9 ± 15.9) fue mayor respecto del tiempo de cópula con una ROS 1:3 (LMC: 19.6 ± 3.11 ; SAO: 20.1 ± 3.85) (Fig. 5.7). Cuando la OSR estuvo sesgada hacia los machos se observaron interacciones entre el macho que estaba copulando a la hembra y los adicionales que intentaron robar a la misma, aunque generalmente no lo lograron. Sin embargo, el tiempo de cópula no difirió entre ambas áreas de estudio ($F=2.41$, $p=0.13$).

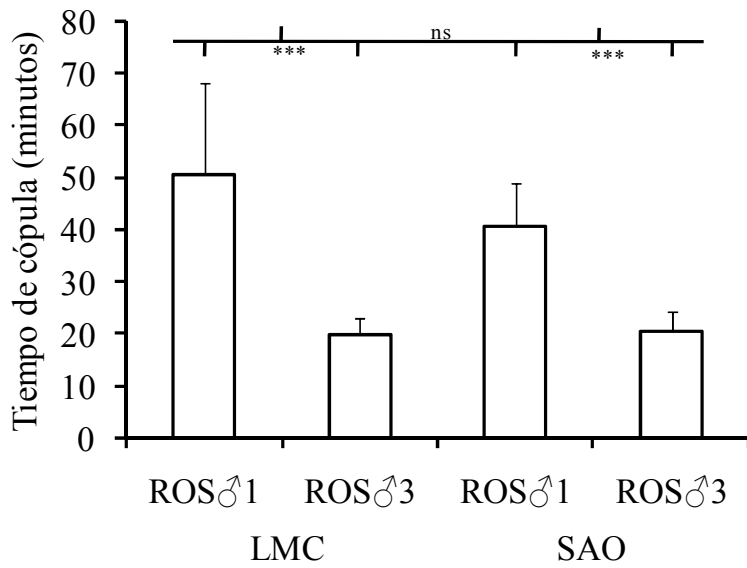


Fig. 5.7. Tiempo de cópula en minutos de individuos de *Neohelice granulata* que copularon en ausencia de otros machos (ROS♂1) versus en presencia de varios machos (ROS♂3) en Laguna Mar Chiquita (LMC), y San Antonio Oeste (SAO). (***) $p < 0.001$; ns, diferencias no significativas).

En el T4, existieron diferencias en el tiempo de cópula entre las hembras que copularon con un macho por única vez versus el de las hembras que fueron copuladas por un macho por segunda vez en ambas áreas de estudio ($F=52.1$, $p < 0.001$): el tiempo de cópula de las hembras que copularon por única vez (47.9 ± 15.9) fue mayor respecto de las que copularon por segunda vez (LMC: 19.18 ± 6 ; SAO: 21.6 ± 5.43) (Fig. 5.8). Sin embargo, el tiempo de cópula en el T4 no difirió entre ambas áreas de estudio ($t=1.28$, $p=0.26$).

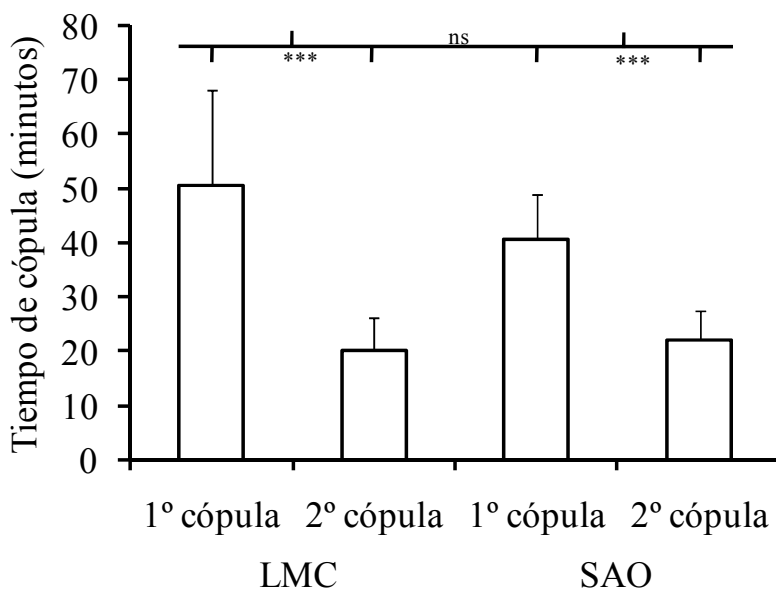


Fig. 5.8. Tiempo de cópula de machos de *Neohelice granulata* que copularon con una hembra que no había copulado (1° cópula) versus machos que copularon con una hembra ya copulada (2° cópula) en Laguna Mar Chiquita (LMC), y San Antonio Oeste (SAO). (***) $p < 0.001$; ns, diferencias no significativas).

Experimentos de comportamiento de cuidado post-copulatorio en individuos de LMC en laboratorio

El desarrollo de un comportamiento de post-cópula exitoso dependió de la presencia de cuevas ($\chi^2=9.6$, $p<0.01$, Fig. 5.9a). Respecto de la ROS, no se encontraron diferencias entre ambos tratamientos ($\chi^2=0.007$, $p=0.12$, Fig. 5.9b). Sin embargo, en cada tratamiento, existieron diferencias en el desarrollo de un comportamiento de cuidado de post-cópula exitoso entre ambas condiciones: tanto cuando la ROS estuvo sesgada en favor de los machos (T1) así como cuando la ROS fue 1:1 (T2), los machos cuidaron a las hembras en post-cópula en presencia de cuevas (condiciones 1 y 3), mientras que no lo hicieron en ausencia de cuevas (condiciones 2 y 4) ($Z=2.6$, $p<0.01$; $Z=2.45$, $p<0.05$; respectivamente). De esta manera, se observó que el cuidado de post-cópula exitoso dependió de la presencia de cuevas y fue independiente de la ROS.

Respecto de la duración de la receptividad de las hembras, se encontraron diferencias entre ambos tratamientos, de receptividad corta *versus* extendida ($\chi^2=22.5$, $p<0.001$, Fig. 5.9c). En el T1 (hembras de receptividad corta) se encontraron diferencias en el desarrollo de un comportamiento de post-cópula exitoso respecto de la presencia de cuevas: los machos cuidaron hembras cuando existieron cuevas (condición 1) mientras que no lo hicieron en ausencia de las mismas (condición 2) ($Z=3.28$, $p<0.01$). Sin embargo, en el T2 (hembras de receptividad extendida) no existieron diferencias respecto de la presencia o ausencia de cuevas: los machos no cuidaron a las hembras, independientemente de la presencia (condición 3) o ausencia (condición 4) de cuevas ($Z=1.12$, $p=0.26$). De esta manera, se observó que el comportamiento de cuidado post-copulatorio exitoso dependió de la presencia de cuevas y de la receptividad de las hembras.

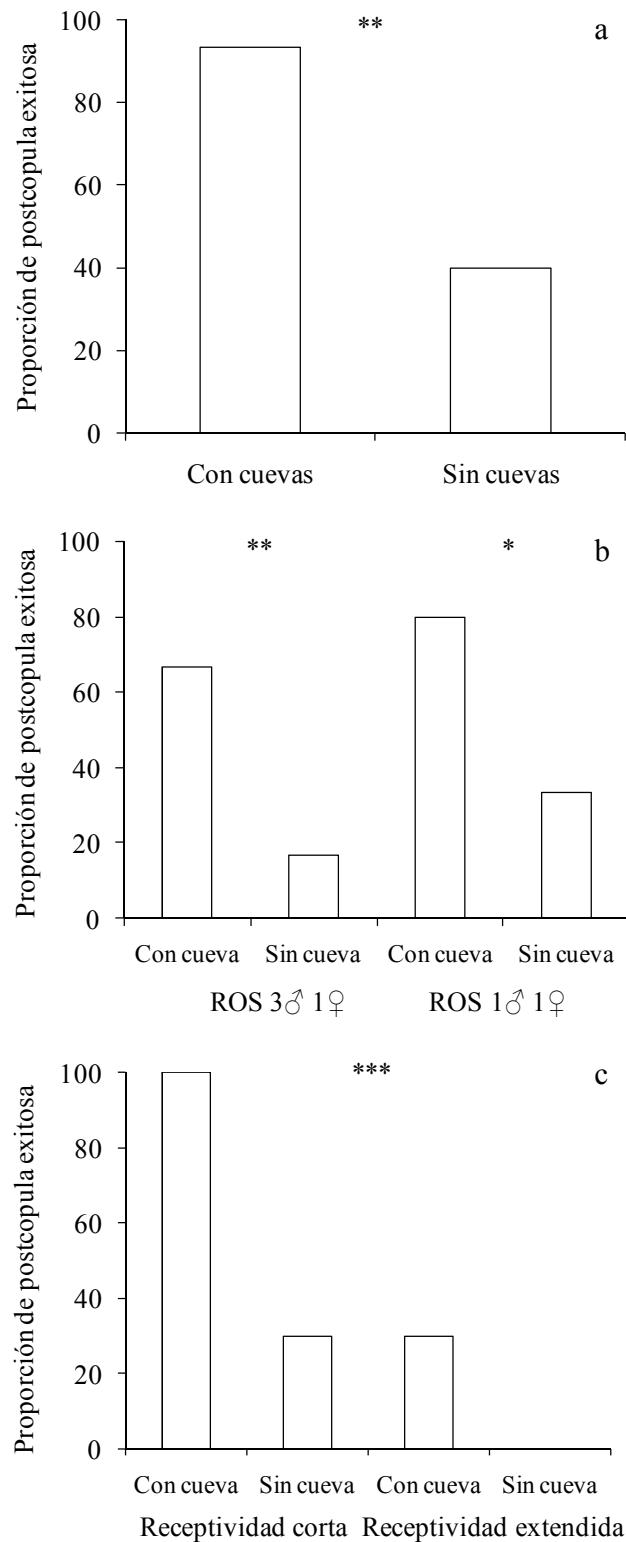


Fig. 5.9. Comportamiento de cuidado post-copulatorio exitoso en hembras de *Neohelice granulata* de la Laguna Mar Chiquita dependiente de los factores: **a.** Presencia *versus* ausencia de cuevas. **b.** Relación operacional de sexos (ROS) sesgada en favor de los machos (3:1) *versus* ROS no sesgada (1:1), en presencia y ausencia de cuevas. **c.** Tipo de duración de la receptividad, corta *versus* extendida, en presencia y ausencia de cuevas. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Respecto de la talla de los machos, no se encontraron diferencias en el desarrollo de un cuidado de la hembra post-copulatorio exitoso entre tratamientos ($\chi^2=7.6$, $p>0.05$). Sin embargo, en ambos tratamientos, existieron diferencias en el desarrollo de una post-cópula exitosa entre ambas condiciones: tanto machos grandes (T1) como machos chicos (T2), cuidaron hembras en presencia de cuevas (condiciones 1 y 3), mientras que no lo hicieron en su ausencia (condiciones 2 y 4) ($Z=1.65$, $p<0.05$; $Z=2.05$, $p<0.05$; respectivamente). De esta manera se observó que el cuidado de post-cópula exitoso fue dependiente de la presencia de cuevas pero independiente de la talla del macho.

Experimentos de comportamiento de cuidado post-copulatorio en individuos de SAO en laboratorio

El desarrollo de un comportamiento de cuidado post-copulatorio de la hembra exitoso fue independiente de la presencia de cuevas ($\chi^2=0.95$, $p>0.05$), pero dependiente de la ROS ($\chi^2=10.7$, $p<0.01$) y de la duración de la receptividad ($\chi^2=7.5$, $p<0.01$) (Fig. 5.10a, b): cuando la ROS fue 1:1 y las hembras presentaron una receptividad del tipo corta, respectivamente, el cuidado post-copulatorio de la hembra por parte de los machos fue exitoso. Respecto de la talla del macho, no se encontraron diferencias en el desarrollo de un comportamiento de post-cópula exitoso ($\chi^2=1.33$, $p=0.39$).

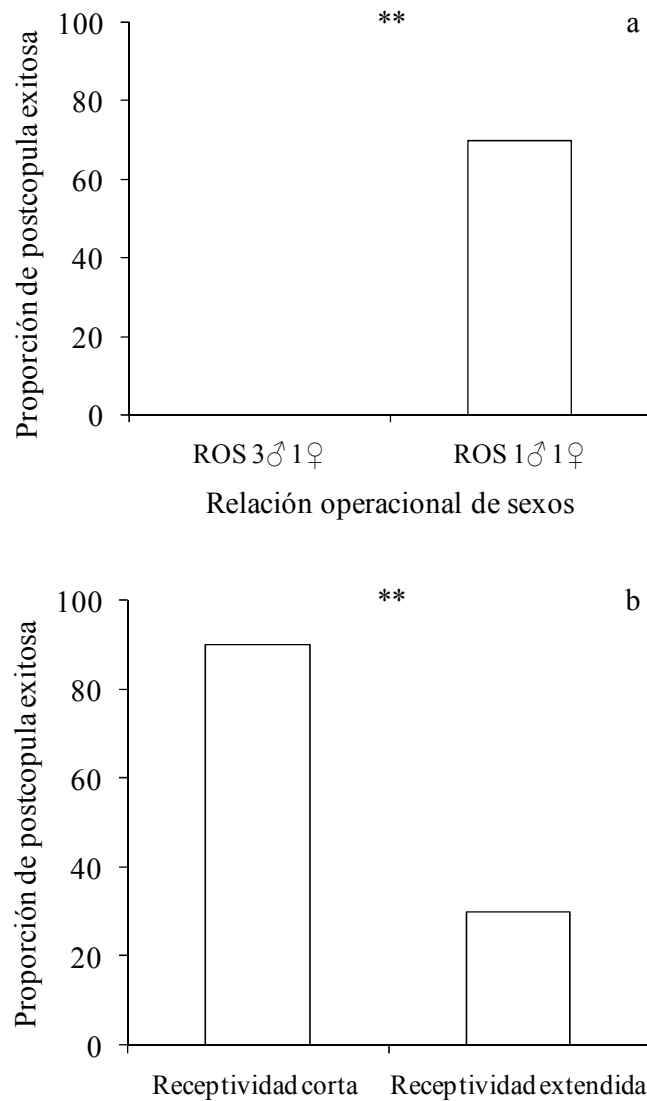


Fig. 5.10. Comportamiento de cuidado post-copulatorio exitoso en hembras de *Neohelice granulata* de San Antonio Oeste dependiente de los factores: **a.** relación operacional de sexos (ROS) sesgada en favor de los machos (3:1) *versus* ROS no sesgada (1:1); y **b.** tipo de duración de la receptividad, corta *versus* extendida. (** $p < 0.01$).

Experimento de actividad de hembras de LMC en laboratorio

Se encontraron diferencias entre las hembras de receptividad corta, las de receptividad extendida y las ovígeras (ANOVA $F=3.48$, $p<0.05$). El test de Tukey posterior mostró que la actividad ambulatoria de las hembras difirió entre el T1 y el T2 (hembras de receptividad corta y extendida, respectivamente) ($p<0.05$), mientras que no

se encontraron diferencias entre el T1 y el T3 (T3: hembras ovígeras), ni entre el T2 y el T3 (Fig. 5.11).

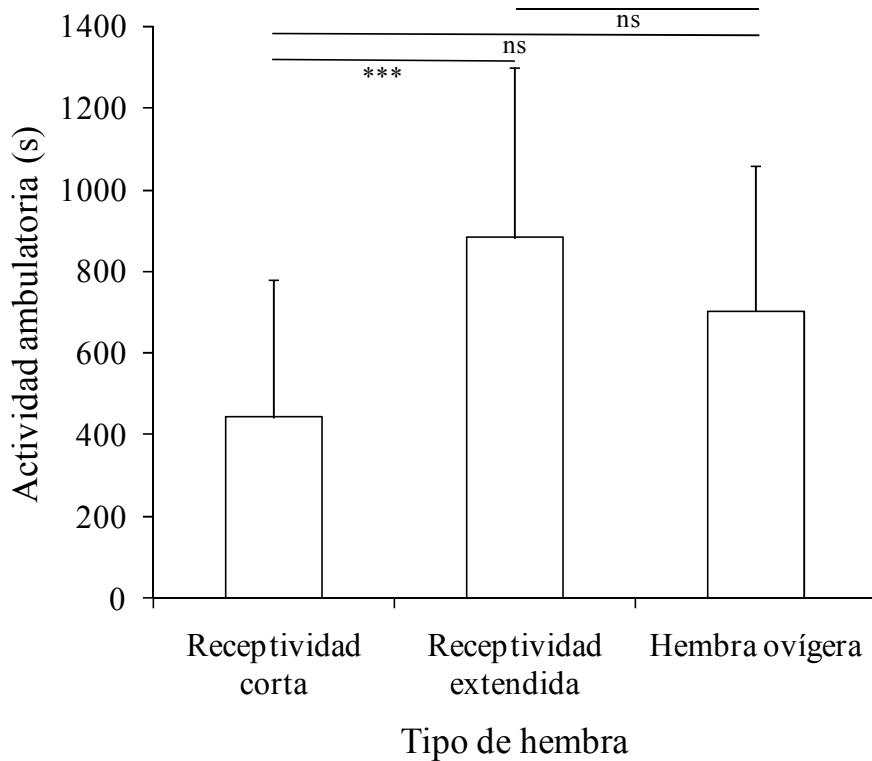


Fig. 5.11. Actividad ambulatoria de hembras de *Neohelice granulata* de la Laguna Mar Chiquita en segundos (s) en tres tratamientos: hembras de receptividad corta, hembras de receptividad extendida y hembras ovígeras. Las líneas horizontales indican las comparaciones entre tratamientos mediante Test de Tukey (***) $p < 0.001$; ns, diferencias no significativas).

Se observaron distintos tipos de comportamientos de las hembras en los tres tratamientos. Las hembras de receptividad corta mostraron escasa actividad ambulatoria (334.2 ± 337.7), generalmente permanecieron debajo de la roca que actuó como refugio alternativo o se enterraron en el sedimento. Por el contrario, las hembras de receptividad extendida mostraron gran actividad (727.4 ± 417.5), se desplazaron por todo el acuario y realizaron un comportamiento de “búsqueda” y “prueba” de los machos en sus cuevas. Dicho comportamiento consistió en que la hembra se acercó alternativamente a la entrada de una u otra cueva de los machos, donde se observó contacto entre ambos individuos. El contacto involucró a las tres últimas patas de ambos individuos y consistió en movimientos cortos alternados de contacto y separación a modo de

“palparse” uno a otro. Este comportamiento fue repetido varias veces, de 3 a 5 veces en cada cueva: la hembra se acercaba a la entrada de la cueva de uno de los machos, ocurría el contacto descripto, y luego salía de la entrada de la cueva y se dirigía a la del otro macho donde repetía estos movimientos. El comportamiento de contacto finalizó cuando la hembra ingresó completamente a alguna de las dos cuevas, o cuando alguno de los dos machos salió de su cueva, tomó a la hembra con sus quelas, y la colocó en la posición esterno con esterno, seguida de la cópula. En el caso de las hembras ovígeras se observó que las mismas pudieron presentar, alternativamente, poca o mucha actividad (582.5 ± 357.6), enterrándose o escondiéndose en el refugio alternativo, o desplazándose por el acuario e ingresando a la cueva del macho, pero sin ser interceptadas ni copuladas por estos.

Discusión

En el presente capítulo se describió el comportamiento de pre-cópula, cópula y post-cópula de *Neohelice granulata* y, mediante distintos experimentos, se demostró que existen factores, como la ROS, la duración de la receptividad de la hembra, la talla del macho o la presencia de cuevas (asociada al tipo de hábitat ocupado), que los estarían influenciando. Además, estos comportamientos variaron entre individuos provenientes de las dos áreas de estudio, LMC y SAO.

Comportamiento de cuidado pre-copulatorio

Se predice que el comportamiento de cuidado de pre-cópula se desarrollará en especies que presenten una ROS desviada (Emlen y Oring 1977) y en aquellas en las cuales el apareamiento está restringido a un período corto determinado (Grafen y Ridley 1983), ambas características reconocidas para *Neohelice granulata*. En el presente capítulo se demostró que en *N. granulata* existe un cuidado de pre-cópula de las hembras por parte de los machos durante un período corto (aproximadamente 1 día) previo a que las misma se vuelvan receptivas. En este caso, las hembras salen de sus cuevas en la condición no receptiva y buscan cuevas de MG, donde se vuelven receptivas y, posteriormente, ocurre el apareamiento. Estos resultados se condicen con

lo encontrado en el capítulo IV, en el cual se demostró que la elección de la pareja en esta especie es llevada a cabo por parte de las hembras. De esta forma, las hembras constituirían el sexo de búsqueda de la pareja y tendrían la capacidad de reconocer que se encuentran cercanas al período de receptividad, momento en el cual abandonarían sus cuevas para buscar y elegir una cueva de un macho apta para el apareamiento. Esta capacidad de las hembras de reconocer que se encuentran cercanas al período de receptividad fue descrita para varias especies de carideos (ver Bauer 2011). Por el contrario, en el caso de otros Varunidae, como por ejemplo del género *Hemigrapsus*, se ha descrito que no existe comportamiento de pre-cópula, aunque esto se debería a la escasez de estudios realizados en la familia (Brockerhoff y McLay 2005c).

Si bien en el capítulo IV se demostró que los machos no seleccionan hembras receptivas respecto de las no receptivas, los resultados obtenidos en el presente capítulo, sugieren que los machos dentro de las cuevas tendrían la capacidad de detectar que la hembra se encuentra cercana a su periodo de receptividad, y consecuentemente, la aceptan en su cueva. En el isópodo *Asellus aquaticus*, se demostró que los machos sólo reconocieron a las hembras receptivas cuando éstas se encontraban a una distancia no menor a 5 cm (Bertin y Cezilly 2005). Es importante destacar además en este punto, que si bien la hembra de *N. granulata* no se encuentra receptiva morfológicamente (su opérculo es inmóvil), sí se encontraría receptiva fisiológicamente en el período previo a que su opérculo se vuelva móvil, y esta condición sería detectada por los machos. Dado que el tiempo de cuidado es crítico para el *fitness* de los machos, es esperable que los mismos desarrollen capacidad sensorial para reconocer el tiempo restante hasta que la hembra se vuelva receptiva (Jormalainen 1998, 2007). Específicamente, en el cangrejo violinista *Uca paradussumieri*, se demostró que los machos pueden detectar químicamente cuándo la hembra se encuentra cercana al período de ovulación (Murai et al. 2002). Este sistema de apareamiento en el cual las hembras son móviles y eligen a los machos y a sus cuevas en las cuales copulan es también descrito para la mayoría de los ocipódidos (ver Jormalainen 2007; Christy 2007 y sus referencias).

Los resultados obtenidos en el experimento de actividad de las hembras indican que las hembras de receptividad extendida son las que presentan mayor movilidad, buscando y eligiendo cuevas y machos, a través del comportamiento de cortejo descrito. A partir de lo encontrado en el capítulo III, donde se observó que las hembras

de receptividad extendida presentaron receptáculos seminales vacíos o con poco esperma, mientras que las de receptividad corta presentaron receptáculos llenos, se concluye que las hembras de receptividad extendida presentan mayor movilidad, buscando y eligiendo cuevas de machos en las cuales aparearse y llenar sus receptáculos seminales. En el caso de las de receptividad corta, estas hembras, dado que presentan sus receptáculos seminales llenos, preferían mantener sus cuevas y no copular, evitando los riesgos de predación o enfermedad asociados al apareamiento, como se ha encontrado que estos riesgos ocurren en otras especies (Elwood y Neil 1992; Benhalima y Moriyasu 2001).

Se ha demostrado que el desarrollo de un cuidado pre-copulatorio exitoso depende de la talla del macho, aunque en estos casos los machos son los que compiten entre ellos por la elección y posterior cuidado de la hembra (Wada et al. 1999). En el caso de *N. granulata*, el cuidado de pre-cópula dependería indirectamente de la talla del macho, dado que las cuevas con cámaras en las cuales se desarrolla son construidas por los machos grandes. Sin embargo, en futuros experimentos se utilizarán más de un macho para testear si existe interacción directa entre el macho dueño de la cueva y otro/s macho/s adicionales, afectando el comportamiento de pre-cópula.

En el caso de SAO, si bien no se realizaron experimentos para estudiar la existencia de un comportamiento de cuidado pre-copulatorio como parte de la presente tesis, se sugiere que, dada la morfología de la cueva de los machos grandes con cámaras abiertas, el cuidado de pre-cópula no sería exitoso debido a la mayor probabilidad de que ocurran interacciones con otros machos, al igual que se demostró para el desarrollo de un cuidado post-copulatorio exitoso en este área de estudio (resultados capítulo II). Sin embargo, futuros experimentos permitirán esclarecer esta cuestión.

Comportamiento de cópula

Respecto del tiempo de cópula, el resultado que muestra que no existieron diferencias entre MC o MG, podría indicar que ambos tipos de machos estarían transfiriendo una misma cantidad de esperma. A partir de lo encontrado en el capítulo II, dado que el apareamiento de los MC sería más aleatorio porque no construyen cuevas con cámaras sino que copularían con las hembras que encuentran al azar en superficie (o en una cueva de un MG cuando logran monopolizarla), indicaría que

cuando tienen la oportunidad de copular con una hembra receptiva, transfieren la mayor cantidad de esperma posible, copulando igual tiempo que un MG, para aumentar las probabilidades de fecundación. Contrariamente, diversos trabajos en distintos taxa han demostrado que los machos de mayores tallas acumulan mayor cantidad de reservas espermáticas (Kwei 1978; Wilber 1987; Pitnick 1996), transfieren eyaculados mayores incluso habiendo copulado recientemente (Markow et al. 1978), y evitan ser desplazados por otros machos durante el apareamiento (Borgia 1981; Howard y Kluge 1985; Elwood et al. 1987). Además, el resultado demostrando que el tiempo de cópula es independiente de la presencia de cuevas, y considerando que en su mayoría los MC son los que copulan en superficie mientras que los MG lo hacen dentro de las cuevas, refuerza la idea acerca de que los primeros, a pesar de no poseer una cueva apta para el apareamiento, cuando encuentran una hembra receptiva al azar, transferirían la mayor cantidad de esperma posible para aumentar las probabilidades de fecundación de los ovocitos. Sin embargo, un estudio realizado en el ocapódido *Macrophthalmus hirtipes*, demostró que el tiempo de cópula fuera de las cuevas fue menor respecto del tiempo de cópula dentro de las cuevas, aunque no se encontró un efecto de la talla del macho sobre la duración de la cópula (Jennings 2000).

Por otro lado, en *N. granulata* se observó que el tiempo de cópula fue dependiente del área de estudio, de una ROS sesgada en favor de los machos, y de si la hembra había copulado recientemente con otro macho. Respecto del área de estudio, de acuerdo a lo descrito en el capítulo II, donde se encontró que en SAO las cuevas construidas por los MG presentan una cámara ensanchada en la cual el cuidado de post-cópula no es exitoso, existe una mayor interacción agresiva entre los machos durante las actividades de apareamiento. Se puede sugerir que la estrategia de acortar el tiempo de cópula favorecería disminuir el tiempo de exposición a la interacción con otros machos, evitando sufrir daños físicos o que la hembra sea robada. En futuros experimentos será interesante testear si la cantidad de esperma transferido es la misma entre individuos de ambas áreas de estudio aunque el tiempo de cópula sea distinto.

La variación en el comportamiento de apareamiento dependiente de las condiciones del medio ambiente también fue descrita en trabajos anteriores (Yamamura 1986; Yamamura y Tsuji 1989). Si bien existen pocos estudios comparando el efecto de las características ambientales sobre las condiciones reproductivas o el

sistema de apareamiento, específicamente en esta especie, se ha demostrado que existe una importante influencia del ambiente sobre estas características (Ituarte 2006; Bas et al. 2007, 2008; resultados obtenidos los capítulos II y III de la presente tesis). A pesar de los tiempos diferenciales de cópula entre ambas poblaciones, *N. granulata* se caracterizó por presentar una cópula promedio de aproximadamente 45 min, tiempo intermedio respecto de lo registrado para otros grapsosideos, como *Austrohelice crassa* y *Hemigrapsus sexdentatus* (10-15 min, Brockerhoff y McLay 2005b), y *Cyclograpsus lavauxi* (2 h, Brockerhoff y McLay 2005c).

En relación a la presencia de machos adicionales, el menor tiempo de cópula se debería a las interacciones observadas entre el macho del par apareado y los machos extras intentando robar hembras, las cuales interrumpirían la cópula. Sin embargo, en *Chionoecetes opilio* se demostró que el tiempo de cópula no es diferente en presencia de un macho rival (Rondeau y Sainte-Marie 2001). Evitar ser desplazado por un macho rival favorecería que el tiempo de cópula y los cuidados copulatorios sean mayores, por lo cual se transferirían mayores eyaculados, aumentando las probabilidades de fecundación de la progenie (McLain 1980; Svard y Wiklund 1988).

Respecto de que la hembra haya copulado recientemente, si bien las hembras de *N. granulata* presentan un receptáculo seminal del tipo ventral donde el último macho en copular es el que tiene mayor probabilidad de fecundar a los ovocitos, de acuerdo a los resultados encontrados el capítulo III, se observó que el esperma proveniente de distintos machos es mezclado en el receptáculo seminal, sin diferenciarse paquetes espermáticos. Consecuentemente, es probable que los machos tengan la capacidad de detectar el grado de llenado del receptáculo, y de esta manera, inviertan menos tiempo y energía en la cópula y transferencia de sus espermatozoides, dado que el esperma sufrirá competencia espermática, siendo más favorable buscar una hembra que se haya vuelto receptiva recientemente sin copular. Otra alternativa sería que la hembra sea la que muestre resistencia a una cópula extendida dado que presenta sus receptáculos seminales llenos. Sin embargo, es esperable que el receptáculo sea lo suficientemente flexible como para permitir acumular eyaculados provenientes de distintos machos. Por el contrario, se ha demostrado que el tiempo de cópula en hembras multíparas de *C. opilio* fue mayor respecto de las hembras primíparas (Rondeau y Sainte-Marie 2001). En este caso, el mayor tiempo de cópula y la mayor transferencia de espermatozoides

estarían asociados con la competencia espermática: en hembras multíparas, es más probable que la competencia espermática sea mayor, por lo cual, la transferencia de mayor cantidad de esperma aumentaría las chances de fecundación.

Comportamiento de cuidado post-copulatorio

En relación al cuidado post-copulatorio, se encontró que en LMC este fue dependiente de la presencia de cuevas y de la receptividad de las hembras, pero independiente de la ROS y de la talla del macho; mientras que en SAO fue independiente de la presencia de cuevas y de la talla del macho, pero dependiente de la receptividad de las hembras y de la ROS. Se ha establecido teóricamente que el comportamiento de cuidado de la pareja dependería de las condiciones del ambiente en el cual los individuos se aparean (Yamamura y Tsuji 1989), tales como si favorecen una sincronización del período de receptividad o una ROS sesgada (Yamamura 1986). Específicamente en esta especie, diferencias en los parámetros reproductivos, estrategias reproductivas y sistema de apareamiento se registraron previamente entre LMC y SAO (Ituarte et al. 2006; Bas et al. 2007, 2008; capítulos II y III de la presente tesis).

Respecto de la receptividad, en el ocapódido *Macrophthalmus hirtipes* se encontró que en ausencia de cuevas no existió cuidado de la hembra (Jennings 2000). De forma similar, en el presente capítulo, se observó que en *N. granulata*, el cuidado de post-cópula dependió de la presencia de cuevas, pero, además, de que las hembras presentaran una receptividad del tipo corta. Se podría sugerir que los machos de *N. granulata* tendrían la capacidad de distinguir entre ambos tipo de hembras (de receptividad corta y extendida) mediante señales químicas, de la misma forma que se propuso en el presente capítulo que los machos tendrían la capacidad de reconocer a las hembras en el período previo a que su opérculo se vuelva móvil. En el ocapódido *Uca lactea*, se encontró que los machos presentaron esta capacidad para reconocer químicamente hembras inmediatas a desovar (Murai et al. 2002). Similarmente, se ha encontrado que en *Halicarcinus cookii* los machos prefieren copular con hembras en el último estadio de desarrollo de los huevos o con hembras no ovígeras, con las cuáles el tiempo de cópula y post-cópula registrado fue el más extendido, siendo capaces de discriminar entre hembras que tendrían la capacidad de re-aparearse antes de desovar, y

hembras que copularían por última vez antes de desovar, de forma de asegurarse la paternidad de la progenie (Van den Brink y McLay 2010). Sin embargo, es interesante destacar que en *N. granulata* la elección de ambos tipos de hembras (con receptividad corta y extendida) también podría depender de la existencia de una señal mecánica dado que existe una cópula de por medio en la cual el macho podría, por ejemplo, evaluar la cantidad de esperma acumulado en el receptáculo seminal y así determinar el tipo de hembra. Por otro lado, se ha estudiado que hembras de ocapódidos tardan más en producir la ovulación y desovar al comienzo de la estación reproductiva, que en el pico de la misma, por lo cual, un macho que copule con una de las primeras hembras, la cuidará más tiempo, se alimentará menos y perderá otras oportunidades de apareamiento, creando un conflicto sexual, siendo probablemente más beneficioso elegir una hembra receptiva en el pico del ciclo (Jormalainen 1998, 2007). En *N. granulata*, los machos prefieren cuidar hembras de receptividad corta, dado que el tiempo de cuidado es menor respecto de una de receptividad extendida, aumentando las probabilidades de apareamiento con otra hembra.

Las hembras de *N. granulata* presentan receptáculo seminal del tipo ventral, por lo tanto, es probable que los machos elijan cuidar hembras de receptividad corta aunque estas posean esperma proveniente de otros machos (como se demostró en el capítulo III) dado que si son los últimos en copular se asegurarían, en un alto grado, la fecundación de los ovocitos. Además, a pesar de que el esperma de *N. granulata* proveniente de distintos machos es mezclado en el receptáculo seminal de las hembras (capítulo III), si la cópula es inmediatamente previa al desove, hay grandes probabilidades de fecundación de los ovocitos. Por lo cual, los machos preferirían copular y cuidar a este tipo de hembras, dado que invertirían menos tiempo en el cuidado respecto de invertir energía en copular con una hembra de receptividad extendida, a la cual deberían cuidarla durante una gran cantidad de días (aun así cuando el macho posea una cueva apta). Por otro lado, se ha demostrado que las hembras de receptividad extendida en su mayoría no desovan, sino que copulan con distintos machos para acumular la mayor cantidad de reservas espermáticas posibles (resultados capítulo III), lo cual reforzaría la hipótesis. Estos resultados respaldan el modelo propuesto por Yamamura (1987) el cual considera el cuidado post-copulatorio y sus costos para los machos, respecto de la variación en la duración de la receptividad de las hembras. En el caso de SAO, la

dependencia entre el cuidado de post-cópula de los machos y la receptividad de las hembras sería más acentuada dado que el período de receptividad “corto” es aún menor que en LMC.

Además, se ha demostrado que el tiempo de cuidado post-copulatorio varía a lo largo de la estación reproductiva de acuerdo a la presencia diferencial de hembras ovígeras *versus* no ovígeras (Christy 1982; Murai et al. 1987; Goshima y Murai 1988; Goshima et al. 1996). Este patrón podría también caracterizar a las hembras de *N. granulata*, en este caso, dependiendo de la presencia de hembras de receptividad extendida *versus* corta a lo largo de la estación reproductiva (capítulo III): al comienzo de la misma los cuidados post-copulatorios serían más extensos dada la presencia mayoritaria de hembras de receptividad extendida, mientras que hacia el final los tiempos de cuidado serían menores dada la presencia mayoritaria de hembras de receptividad corta. Cabe destacar que la duración del cuidado post-copulatorio en hembras de *H. cookii* fue significativamente menor cuando la ROS estuvo sesgada en favor de las hembras, sugiriendo que en esta especie los machos exhiben un comportamiento reproductivo flexible de acuerdo a las fluctuaciones de la población (Van den Brink y McLay 2010). Si bien en *N. granulata* una ROS sesgada en favor de las hembras no es esperable, sí se sugiere que el comportamiento de apareamiento de los machos es lo suficientemente plástico para desarrollar diferentes estrategias reproductivas, como se ha observado que ocurre dadas las diferencias encontradas entre las poblaciones de LMC y SAO.

Respecto de la ROS, la teoría predice que los machos responderían a un aumento de la ROS mediante el cuidado más prolongado de la pareja (Grafen y Ridley 1983; Yamamura y Jormalainen 1996). En *C. opilio* se ha descrito que en presencia de machos rivales, el tiempo de cuidado de post-cópula aumenta, y los machos dominantes aumentan el tiempo de cuidado y la cantidad de esperma transferido (Rondeau y Sainte-Marie 2001). En SAO, los machos de *N. granulata* mostraron este mismo resultado, mientras que en LMC el cuidado de post-cópula no dependió de la ROS pero sí de la presencia de cuevas. Estos resultados se condicen con lo descrito en el capítulo II donde se encontró que el comportamiento de post-cópula no es exitoso en SAO dada la morfología de la cueva. Consecuentemente, es esperable que dicho comportamiento dependa de diversos factores adicionales como una ROS sesgada. En el caso de LMC,

la post-cópula exitosa se observó dependiente de la presencia de cuevas con cámaras, de forma similar a lo registrado en el cangrejo violinista *Uca tetragonon*, donde se describe un comportamiento de cuidado de la hembra dentro de las cuevas hasta el desove (Goshima et al. 1996).

En relación con la talla de los machos, diferentes modelos propuestos en Crustáceos han predicho que los machos de mayores tallas modificarían el tiempo de cuidado de la hembra de acuerdo a diversos factores, respecto de los machos de menores tallas (Grafen y Ridley 1983; Elwood y Dick 1990). Se predice que cuando existen altas probabilidades de competencia entre machos por el acceso a las hembras, el tiempo de cuidado de la hembra variará de acuerdo a su relativa habilidad competitiva respecto de los otros machos (Grafen y Ridley 1983). En el caso de *N. granulata*, en LMC, el cuidado de post-cópula no dependió de la talla del macho directamente, aunque sí de la presencia de cuevas. Dado que las cuevas aptas para el apareamiento son construidas por los machos de mayores de tallas, se sugiere que existe un efecto indirecto de la talla del macho sobre el cuidado exitoso. Se ha establecido que los machos de tallas mayores serían los que cuidan las hembras durante una mayor cantidad de tiempo, reflejando la importancia de la ventaja de la talla para defender hembras y desplazar a los machos más chicos (Sainte-Marie et al. 1997). Este resultado ha sido observado en *Helice crassa*, en el cual los machos grandes copularon más hembras respecto de los chicos (Brockhoff y McLay 2005c). Por otro lado, se encontró que los machos de tallas menores, serían incapaces de mantener a las hembras durante largos períodos dado su menor tamaño de quela, aun cuando las hembras no muestren resistencia hacia ellos (Minouchi y Goshima 1998; Kamio et al. 2003; Sal Moyano y Gavio 2012), o bien, no cuidarían hembras en post-cópula, aparentemente debido a la alta probabilidad de encuentro con los machos de mayores tallas (Wada et al. 1999). En el caso de *N. granulata*, dado que los MC pueden encontrarse en cuevas aptas para el apareamiento construidas por los MG, en las cuales el cuidado de post-cópula es exitoso, se establece que el mismo no depende de la talla del macho, sino de la presencia de cuevas. Respecto de los individuos de SAO, si bien se encontró que el cuidado de post-cópula es independiente de la talla y de la presencia de cuevas, se sugiere que este resultado podría ser debido a la baja cantidad de réplicas (N=10, LMC: 8 machos en post-cópula *versus* 2; SAO: 4 machos en post-cópula *versus* 6), dado que

como en SAO no existe la post-cópula exitosa dentro de las cuevas, la post-cópula fuera de ellas podría depender de factores adicionales como la talla de los machos. Futuros experimentos aumentando la cantidad de réplicas permitirán esclarecer esta hipótesis.

Finalmente, en otras especies, se ha demostrado que el comportamiento de post-cópula depende conjuntamente de la ROS y de la talla del macho. Los machos de mayores tallas cuidan hembras por un tiempo más prolongado en presencia de machos rivales (Kendall y Wolkott 1999). De esta forma, se sugiere que los machos serían capaces de reconocer cambios en la ROS y en su habilidad competitiva respecto de su talla y la de los otros machos, y consecuentemente, flexibilizar sus comportamientos reproductivos (Wada et al. 1999). Esta misma conclusión acerca de la flexibilidad de los comportamientos reproductivos también se establece aquí para los machos de *N. granulata* dadas las diferencias entre los comportamientos de post-cópula observadas en ambas poblaciones de LMC y SAO. Se ha sugerido que los conflictos sexuales generan diversificación del comportamiento de apareamiento. Por ejemplo, en el isópodo *Idotea baltica*, se demostró cómo los conflictos sexuales divergen en dos poblaciones distintas influenciados por las características del ambiente (Jormalainen et al. 2000).

Se establece que cuando las hembras receptoras fecundan múltiples camadas y acumulan esperma proveniente de distintos machos, es esperable que exista competencia entre machos por el acceso a las hembras receptoras y elección de la pareja por parte de las hembras, como ha sido demostrado para *Callinectes sapidus* (Kendall y Wolkott 1999). Además, los modelos teóricos generales predicen que la duración óptima del cuidado por parte del macho es esperable que varíe con diversos factores como la proporción sexual, la probabilidad de encuentro entre individuos de ambos sexos, la frecuencia de interacciones entre machos, la sincronización de la receptividad de hembras y su duración, los costos de búsqueda y la talla de los individuos del par apareado (Yamamura y Jormalainen 1996; Jormalainen 2007). En *N. granulata*, el comportamiento reproductivo de las hembras determinó el éxito del apareamiento de los machos, dado que las hembras son las que eligen machos y sus cuevas iniciando la pre-cópula y posterior cópula. Luego, las características del ambiente y distintos factores como la ROS, la duración de la receptividad de la hembra o la talla del macho, determinarían el éxito del cuidado post-copulatorio, y consecuentemente, el éxito en el reaseguro de la paternidad de la progenie.

A photograph of a sunset over a city skyline. The sun is low on the horizon, creating a bright glow and reflecting on the water in the foreground. The sky is filled with scattered clouds, and the city buildings are silhouetted against the bright light. The overall scene is peaceful and scenic.

Capítulo VI

Discusión General

Discusión general

En la presente tesis doctoral se estudió el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata*, describiéndose las diversas estrategias reproductivas desarrolladas por machos y hembras, y se encontró que existen diferencias entre poblaciones que habitan sitios con características físico-biológicas diferentes. Los resultados generales se discuten en el contexto de los diversos modelos de sistemas de apareamiento y las estrategias reproductivas establecidos por Emlen y Oring (1977), Christy (1987) y Shuster y Wade (2003).

El sistema de apareamiento refleja el patrón de monopolización de la pareja en espacio y tiempo (Shuster y Wade 2003). Consiste en el desarrollo de estrategias sexo-específicas involucradas en aumentar el *fitness* de la descendencia, las cuales se adaptan y dependen del tipo de ambiente (Jormalainen 2007). En esta tesis, se demostró que el sistema de apareamiento de *Neohelice granulata* está basado en la defensa de recursos (cuevas); siendo los machos grandes los que construyen una cueva con cámara destinada a la cópula que, aunque específico, no es el único lugar donde ocurre. En el caso de otros cangrejos grapsóidea, algunos estudios basados en observaciones de campo, mencionaron que el apareamiento ocurre en superficie pero también en el interior de las cuevas, aunque este tipo de sistema de apareamiento basado en la competencia entre machos por la defensa de las cuevas se ha descrito para pocos de ellos, como *Pachygrapsus transversus* y *Sesarma reticulatum* (ver Brockerhoff y McLay 2005a y sus referencias). Por el contrario, en los ocipódidos, gran cantidad de estudios han observado y descrito en detalle que el sistema de apareamiento se encuentra basado en la defensa de cuevas construidas por los machos, las cuales tienen una cámara terminal de apareamiento donde ocurre la cópula (e. j. Backwell y Passmore 1996; deRivera 2005; Christy 2007). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado para *N. granulata*, en los trabajos mencionados no se encontraron diferencias intra-sexuales en los machos de distinta talla respecto de la forma de la cueva.

La teoría de selección sexual predice que cuando la selección intra-sexual es intensa se favorece el desarrollo de estrategias reproductivas alternativas en los machos subordinados o de menores tallas (Andersson 1994). En *N. granulata*, se encontró que los machos de menores tallas no construyen cuevas con cámaras, y consecuentemente,

desarrollan distintas estrategias de apareamiento respecto de los machos de mayores tallas. Estas estrategias incluyen [1] interceptar y copular con hembras receptivas que se encuentren en superficie buscando un macho grande en su cueva (estrategia propuesta para ambas poblaciones en el capítulo II) y, [2] ubicarse en una cueva con cámara construida por un macho grande que esté vacía y esperar el ingreso de una hembra receptiva (encontrado para la población de LMC, resultados capítulo II). Estos comportamientos plásticos y alternativos de los machos de menores tallas han sido propuestos para diversos crustáceos como el camarón *Rhynchocinetes typus* (Thiel y Hinojosa 2003), el isópodo *Idotea baltica* (Jormalainen et al. 2000), la langosta *Homarus americanus* (Atema y Steinbach 2007 y sus referencias), y los cangrejos *Libinia emarginata* (Laufer y Ahl 1995), *Chionoecetes opilio* (Sainte-Marie et al. 2007), *Palthyxanthus crenulatus* (Farias 2011) y *Libinia spinosa* (Sal Moyano y Gavio 2012), entre otros.

Una característica fundamental que determina el tipo de sistema de apareamiento de una especie es la abundancia y distribución de hembras receptivas en tiempo y espacio (Emlen y Oring 1977; Shuster y Wade 2003). A su vez, el tipo de receptividad determina la relación operacional de sexos (ROS). Como consecuencia, la morfología de la vulva y la duración del periodo de receptividad tienen importantes implicancias determinando las estrategias reproductivas desarrolladas por las hembras. La morfología de la vulva de *N. granulata*, caracterizada por la presencia de un opérculo móvil durante un período limitado de receptividad, fue similar a lo encontrado en otros grapsoides (ver Brockerhoff y McLay 2005a, b, c). Sin embargo, la existencia en *N. granulata* de dos tipos de hembras, con receptividades cortas y desove, y con receptividades extendidas y sin desove, sumado a otros atributos morfológicos descriptos, como la presencia de una vulva con opérculo móvil, de secreciones del receptáculo seminal que mantendrían el esperma viable, y de un tejido amorfo en la conexión entre el oviducto y el receptáculo seminal; indican que las hembras tienen la capacidad de desarrollar estrategias reproductivas alternativas que les permiten controlar el momento de la ovulación, fecundación y desove. Esta capacidad de regulación fue descripta para pocas especies de decápodos, en las cuales se encontró que en ausencia de machos, las hembras pueden extender su receptividad (Brockerhoff y McLay 2005b, c), o bien, que las hembras podrían monitorear el contenido de esperma acumulado, y de esta forma,

regular la cantidad de apareamientos de acuerdo a la cantidad de esperma requerido (Atema y Steinbach 2007).

Adicionalmente a las estrategias reproductivas diferenciales desarrolladas por machos y hembras, se ha descrito que, generalmente, uno de los dos sexos es el activo en la búsqueda de la pareja. Es esperable que la selección sexual favorezca el desarrollo de habilidades sensoriales que permitan el encuentro y reconocimiento del estado reproductivo del sexo opuesto, como por ejemplo, la detección de una potencial pareja a la distancia mediada por señales hormonales (Jormalainen 1998 y sus referencias; Jormalainen 2007). En el caso de *N. granulata*, la selección de la pareja para el apareamiento la lleva a cabo la hembra, utilizando señales químicas, mediadas con o sin contacto entre individuos; y eligiendo éstas machos de tallas grandes y no apareados (resultados capítulo IV). Este tipo de selección de la pareja, en el cual la hembra es el sexo que elige, está ampliamente documentada en crustáceos (e. j. Backwell y Passmore 1996; Sato y Goshima 2007; Iyengar y Starks 2008). Se ha registrado además, la utilización de señales químicas durante la elección (e. j. Cowan y Atema 1990; Bushmann 1999; Raethke et al. 2004; Díaz y Thiel 2004). Más específicamente, la elección de machos grandes y/o no apareados fue demostrada para algunos cangrejos (Backwell y Passmore 1996; Sato y Goshima 2007). En *N. granulata*, dado que los machos grandes construyen cuevas con cámaras aptas para el apareamiento y se ubican dentro de ellas, es esperable el resultado que muestra que las hembras son las que tienen la capacidad de buscar y seleccionar a los machos en sus cuevas con las mejores características para el apareamiento. Como se mencionó en el capítulo II, las hembras seleccionarían a la pareja en base a la combinación de dos criterios: la talla del macho y la calidad del recurso (cuevas). Sin embargo, debe destacarse que los machos de tallas chicas pudieron encontrarse en las cuevas de los machos grandes en los muestreos al azar realizados en LMC (resultados capítulo II), por lo cual, en estos casos, la cueva podría representar una señal deshonestas para las hembras. Futuros experimentos en los cuales se ponga a prueba la importancia de ambos factores (talla del macho y calidad de la cueva) en forma independiente permitirán esclarecer esta cuestión.

Por otro lado, es esperable el resultado obtenido acerca de que las señales visuales no tendrían importancia en la selección de la pareja, dado que los machos se ubican y esperan a las hembras dentro de sus cuevas, desde donde no son visibles.

Diferente es el caso de los ocapódidos, donde las señales visuales son importantes dado que los machos desarrollan un comportamiento de cortejo en superficie, al lado de su cueva, el cual es visible para las hembras y determina si éste será seleccionado por la hembra (Christy y Rittschof 2011). Además, en *N. granulata*, el comportamiento reproductivo descrito en el capítulo V, en el cual las hembras receptivas que buscan machos en sus cuevas los contactan y palpan primeramente con sus patas, refuerza la hipótesis de que la selección y el reconocimiento de la pareja se realizan por medio de señales químicas más que visuales.

Las hembras mostraron estrategias reproductivas poco comunes en cangrejos, dado que iniciaron comportamientos de pre-copula poco tiempo antes de que se manifestara externamente el periodo de receptividad, abandonando su cueva y buscando y seleccionando la cueva de un macho apta para copular, mediante el uso de señales químicas, aproximadamente un día antes de que su opérculo se vuelva móvil. Si bien se predice que el comportamiento de cuidado de pre-cópula se desarrolla frecuentemente en especies con ROS desviadas (Emlen y Oring 1977; Grafen y Ridley 1983), su ocurrencia en los Varunidae ha sido rara vez mencionada. Los machos, tienen la capacidad de detectar la condición de la hembra y, consecuentemente, aparearse o no, desarrollar un comportamiento de post-cópula o no, de acuerdo a diversos factores.

Tanto los comportamientos de cuidado pre como post-copulatorios son altamente flexibles y se encuentran influenciados por factores socio-sexuales (Rondeau y Sainte-Marie 2001; Sainte-Marie et al. 2008), permitiendo que los machos cuiden hembras en el momento previo y durante el período de su receptividad y que, de esta forma, aseguren la paternidad de la progenie (Parker 1974; Grafen y Ridley 1983). En *N. granulata*, la ocurrencia de cuidados post-copulatorios exitosos depende de la forma de la cueva (con cámara de apareamiento en el interior de la cueva), del tipo de receptividad (corta) de las hembras y de la ROS (aunque existen variaciones entre poblaciones, ver capítulos II y V). Es esperable que el desarrollo de comportamientos de cuidado post-copulatorios sea una estrategia común en los grapsoideos dado que presentan un receptáculo seminal del tipo ventral y, consecuentemente, una probabilidad mayor de que el último macho en copular fecunde a los ovocitos. Sin embargo, pocos trabajos han verificado esta predicción, aunque se cree que esto se debería a la escasez de estudios realizados en esta temática en dicho grupo (Brockerhoff y McLay 2005a).

Los resultados obtenidos en los capítulos II, III y V demuestran que existen diferencias poblacionales en relación a las estrategias reproductivas desarrolladas en ambas áreas de estudio. La arquitectura de las cuevas fue distinta en LMC y SAO, atribuido a las diferentes características del sedimento, y como consecuencia, se encontraron diferencias respecto de los comportamientos de cuidado de post-cópula exitosos entre ambas poblaciones, es decir, diferencias en las estrategias comportamentales (resultados capítulo II). Por otro lado, la duración y frecuencia del período de receptividad de las hembras también varió entre ambas poblaciones: [1] la duración de la receptividad es más corta en SAO, estrategia asociada a que al acortar el tiempo de receptividad se disminuye el riesgo de exposición a las interacciones agonísticas entre machos durante la cópula y post-cópula, y la vulnerabilidad a otros factores físicos y biológicos; [2] la frecuencia de receptividad fue menor en SAO dado que el período reproductivo es aquí más corto (3-4 *versus* 5-6 meses) mientras que la duración del desarrollo embrionario es la misma en ambas áreas de estudio (resultados capítulo III). De forma similar, el tiempo de cópula varió entre ambos sitios de estudio, siendo mayor en LMC respecto de SAO; así como se encontró que existieron factores diferentes que influenciaron la duración de los comportamientos de cuidado post-copulatorios en ambas poblaciones: en LMC el cuidado post-copulatorio exitoso dependió de la presencia de cuevas y de la duración de la receptividad de las hembras, mientras que en SAO dependió también de la duración de la receptividad de las hembras, pero, además, de la ROS (resultados capítulo V). Estos resultados, proveen evidencia acerca de que el ambiente y sus características físicas, y el contexto social, tienen la capacidad de modular las estrategias y el comportamiento sexual de poblaciones distintas, de modo de maximizar el *fitness* de la especie en cada ambiente particular, como ha sido descrito para otras especies (Chapman et al. 2003; Cordero y Eberhard 2005; Kokko 2005; Thiel y Duffy 2007). Diferentes poblaciones podrían desarrollar distintos sistemas de apareamiento, siempre que los individuos de cada población o las especies estén experimentando condiciones ecológicas distintas. El cambio de un sistema de apareamiento a otro no sólo dependería de las condiciones del ambiente, sino también de cuán flexible sean las especies en términos de comportamiento, fisiología o atributos morfológicos (Baeza y Thiel 2007). En este contexto, se ha observado que *N. granulata* constituye una especie plástica en términos

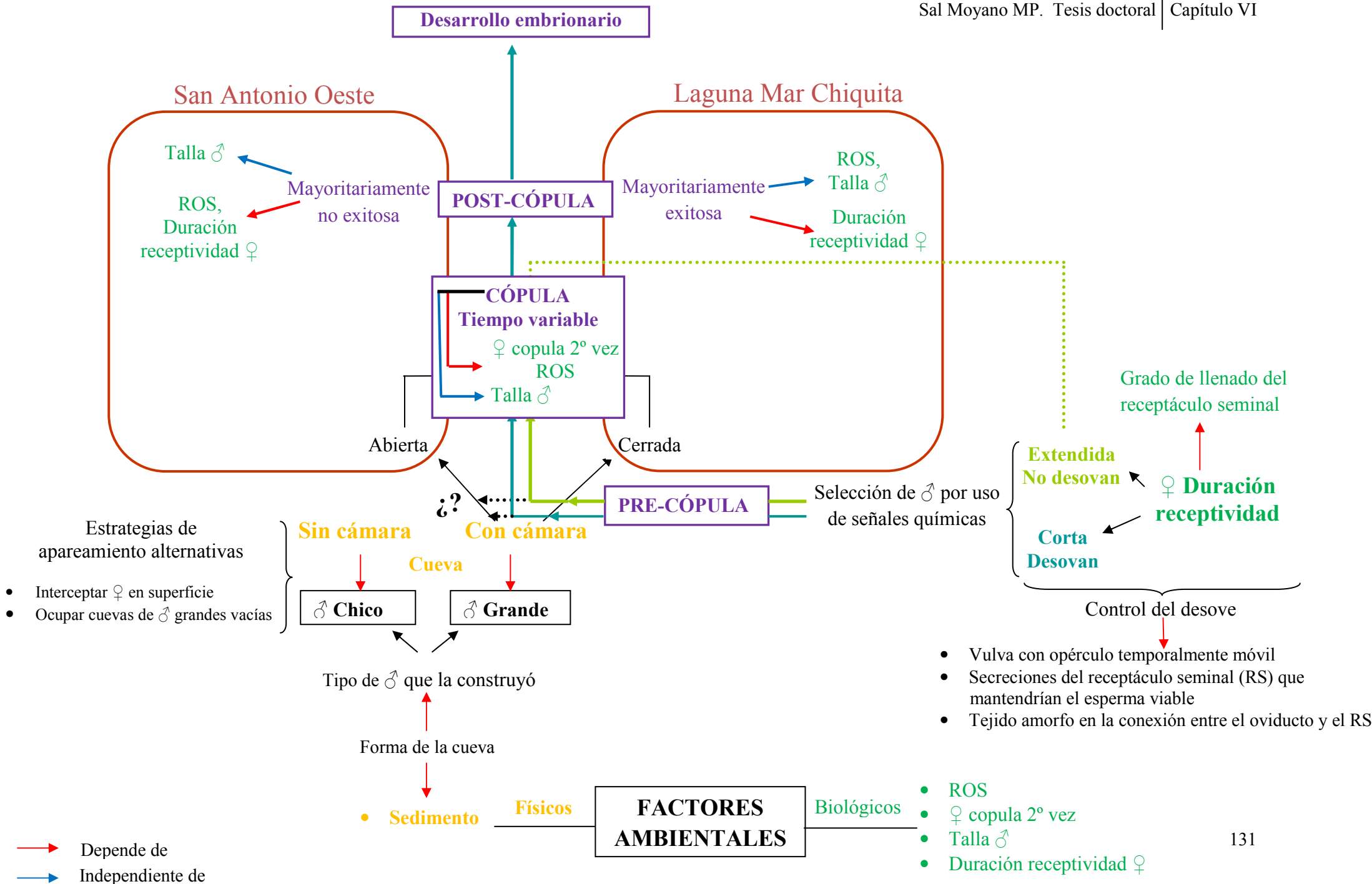
comportamentales, fisiológicos y morfológicos, los cuales les permiten modular sus estrategias reproductivas de modo de que cada sexo aumente su *fitness* reproductivo en cada ambiente particular.

Como conclusión, se establece que el sistema de apareamiento de *N. granulata* está basado en la defensa del recurso “cuevas” construidas por los machos de mayores tallas. Es importante destacar que, los resultados aquí presentados, demuestran que existe una importante influencia de las condiciones físico-biológicas dependientes del tipo de sitio de estudio, LMC y SAO, las cuales modulan en gran medida el sistema de apareamiento y las estrategias reproductivas desarrolladas por ambos sexos de *N. granulata*.

A modo de resumen de la información obtenida en todos los capítulos de la presente tesis, se muestra a continuación un diagrama conceptual en el cual se indican los principales factores, tanto biológicos y físicos, y cómo éstos influyen el sistema de apareamiento y las estrategias reproductivas en ambas áreas de estudio.

- ♣ La forma de la cueva con cámara construida por los machos grandes depende del tipo de sedimento del área de estudio, presentando una cámara cerrada en LMC y una abierta en SAO.
- ♣ Los machos chicos construyen cuevas sin cámaras en las cuales no ocurre la cópula, por lo cual, presentan estrategias reproductivas alternativas: interceptar hembras en superficie u ocupar cuevas con cámaras construidas por los machos grandes que se encuentren vacías.
- ♣ Los machos en las cuevas con cámaras son elegidos por las hembras receptivas, mediante la utilización de señales químicas, para iniciar el comportamiento de pre-cópula.
- ♣ La cópula ocurre en cuevas con ambos tipos de cámaras –abierta y cerrada–, aunque el tiempo de la misma varía entre áreas de estudio, depende de la ROS y de si la hembra ha copulado recientemente (líneas rojas), y es independiente de la presencia de cuevas (líneas azules).
- ♣ El cuidado post-copulatorio es generalmente exitoso en las cuevas con cámaras cerradas de LMC, donde además, depende de la duración de la receptividad de las hembras (líneas rojas) y es independiente de la ROS y de la talla del macho (líneas azules).

- △ En las cuevas con cámaras abiertas de SAO, el cuidado post-copulatorio es mayoritariamente no exitoso, pero depende de la ROS y de la duración de la receptividad de las hembras (líneas rojas), aunque es independiente de la talla del macho (líneas azules). Si la hembra presenta receptividad corta, luego del cuidado de post-cópula, ocurre el desove y comienza el desarrollo embrionario. Si la hembra presenta receptividad extendida, el cuidado de post-cópula es generalmente no exitoso, la hembra no desova y vuelve a iniciar el comportamiento de pre-cópula para copular nuevamente con otro macho. La duración de la receptividad de las hembras depende del grado de llenado del receptáculo seminal (línea roja). La capacidad de las mismas de regular el momento del desove depende de diversos atributos morfológicos y fisiológicos (línea roja): una vulva con opérculo temporalmente móvil, secreciones del receptáculo seminal que mantendrían el esperma acumulado viable, y un tejido amorfo en la conexión entre el oviducto y el receptáculo seminal.



Bibliografía



Bibliografía

- Abele L, Campanella PJ, Salmon M (1986) Natural history and social organization of the semiterrestrial grapsid crab *Pachygrapsus transversus* (Gibbes). 1. Exp Mar Biol Ecol 104:153–170
- Andersson M (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 624 pp
- Anilkumar G, Sudha K, Subramoniam T (1996) Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the Brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Forsk). J Crust Biol 16:310–314
- Anilkumar G, Sudha K, Subramoniam T (1999) Spermatophore transfer and sperm structure in the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Decapoda: Grapsidae). J Crust Biol 19:361–370
- Aquiloni L, Gherardi F (2008) Assessing mate size in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: effect of visual versus chemical stimuli. Freshwater Biol 53:461–469
- Arnqvist G, Rowe L (2005) Sexual conflict. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Atema J, Steinbach M (2007) Chemical communication and social behavior of the lobster, *Homarus americanus*, and other decapod Crustacea. En: Duffy J, Thiel M (eds) Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms. Oxford University Press, New York, 115–144 pp
- Backwell P, Jennions M, Passmore N, Christy J (1998) Synchronized courtship in fiddler crabs. Nature 391:31–32
- Backwell PRY, Passmore NI (1996) Time constraints and multiple choice criteria in the sampling behavior and mate choice of the fiddler crab, *Uca annulipes*. Behav Ecol Sociobiol 38:407–416
- Baeza JA, Thiel M (2007) The mating system of symbiotic crustaceans: a conceptual model based on optimality and ecological constraints. En: Duffy JE, Thiel M (eds) Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms, Oxford University Press, 249–267 pp
- Balmford AP, Albon SD, Blakeman SJ (1992) Correlates of male mating success and female choice in a lek-breeding antelope. Behav Ecol 3:112–123

- Barata EN, Hubbard PC, Almeida OG, Miranda A, Canário AVM (2007) Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). BMC Biology 5:54
- Bas C, Luppi T, Spivak E (2005) Population structure of the South American Estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae) near the southern limit of its geographical distribution: comparison between northern populations. Hydrobiologia 537:217–228
- Bas CC, Spivak ED, Anger K (2007) Seasonal and interpopulational variability in fecundity, egg size, and elemental composition (CHN) of eggs and larvae in a grapsoid crab, *Chasmagnathus granulatus*. Helgol Mar Res 61:225–237
- Bas CC, Spivak ED, Anger K (2008) Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Helgol Mar Res 62:393–401
- Bateman AJ (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. Heredity 2:349–368
- Bauer RT (2011) Chemical communication in decapods shrimps: the influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones. En: Breithaupt T, Thiel M (eds) Chemical communication in crustaceans. Springer, New York, 277–296 pp
- Bauer RT, Abdalla JA (2001) Male mating tactics in the shrimp *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea): precopulatory mate guarding vs. pure searching. Ethology 107:185–199
- Becker C, Brandis D, Storch V (2011) Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). J Morph 272:12–26
- Benhalima K, Moriyasu M (2001) Prevalence of bacteria in the spermatheca of female snow crab, *Chionoecetes oipilo* (Brachyura: Majidae). Hidrobiologia 449:261–266.
- Beninger P, Elnor R, Foyle T, Odense P (1988) Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes oipilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. J Crust Biol 8:322–332

- Beninger P, Elnor R, Poussart Y (1991) The gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *J Crust Biol* 11:217–228
- Berglund A, Bisazza A, Pilastro A (1996) Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biol J Linn Soc* 58:385–399
- Berrill M, Arsenault M (1982) Mating behavior of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Bull Mur Sci* 32:632–638
- Berrill M, Arsenault M (1984) The breeding behavior of a northern temperate orconectid crayfish, *Orconectes rusticus*. *Anim Behav* 32:333–339
- Bertin A, Cezilly F (2005) Density-dependent influence of male characters on mate-locating efficiency and pairing success in the waterlouse *Asellus aquaticus*: an experimental study. *J Zool* 265:333–338
- Borgia G (1981) Mate selection in the fly *Scutophuga stercorurii*: female choice in a male-controlled system. *Anim Behav* 29:71–80
- Borowsky B (1985) Responses of the amphipod crustacean *Gammarus palustris* to waterborne secretions of conspecifics and congeners. *J Chem Ecol* 11:1545–1552
- Borowsky B (1991) Patterns of reproduction of some amphipod crustaceans and insights into the nature of their stimuli. En: *Crustacean Sexual Biology*. Bauer RT, Martin JW (eds.) Columbia University Press, New York, 33–49 pp
- Bouchard S, Sainte-Marie B, McNeil JN (1996) Indirect evidence indicates female semiochemicals release male precopulatory behaviour in the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). *Chemoecology* 7:39–44
- Breithaupt T, Atema J (2000) The timing of chemical signaling with urine in dominance fights of male lobsters (*Homarus americanus*). *Behav Ecol Sociobiol* 49:67–78
- Breithaupt T, Eger P (2002) Urine makes the difference: chemical communication in fighting crayfish made visible. *J Exp Biol* 205:1221–1231
- Brockhoff A, McLay C (2005a) Factors influencing the onset and duration of receptivity of female purple rock crabs, *Hemigrapsus sexdentatus* (H. Milne Edwards, 1837) (Brachyura: Grapsidae) *J Exp Mar Biol Ecol* 314:123–135
- Brockhoff A, McLay C (2005b) Mating behavior, female receptivity and male-male competition in the intertidal crab *Hemigrapsus sexdentatus* (Brachyura: Grapsidae). *Mar Ecol Prog Ser* 290:179–191

- Brockerhoff A, McLay C (2005c) Comparative analysis of the mating strategies in grapsid crabs with special reference to two common intertidal crabs *Cyclograpsus lavauxi* and *Helice crassa* (Decapoda: Grapsidae) from New Zealand. *J Crust Biol* 25:507–520
- Burggren WW, McMahon BR (1988) *Biology of the land crabs*. Cambridge University Press, Cambridge, 479 pp
- Burley N (1981) Mate choice by multiple criteria in a monogamous species. *Am Nat* 117:515–528
- Bushmann PJ (1999) Concurrent signals and behavioral plasticity in blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) courtship. *Biol Bul* 197:63–71
- Bushmann PJ, Atema J (2000) Chemically mediated mate location and evaluation in the lobster, *Homarus americanus*. *J Chem Ecol* 26:883–899
- Carvacho A (1989) *Cancer johngarthi* and *Cancer porteri* (Crustacea, Decapoda): comparisons and hypothesis. *Proc Biol Sot Wash* 102:613-619
- Caskey JL, Bauer RT (2005) Behavioral test for a possible contact sex pheromone in the caridean shrimp *Palaemonetes pugio*. *J Crust Biol* 25:571–576
- Caubet Y, Juchault P, Mocquard J (1998) Biotic triggers of female reproduction in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidae). *Ethol Ecol Evol* 10:209–226
- Chan BKK, Chan KKY, Leung PCM (2006) Burrow architecture of the ghost crab *Ocypode ceratophthalma* on a sandy shore in Hong Kong. *Hydrobiologia* 560:43–49
- Chang ES, Kaufman WR (2005) Endocrinology of Crustacea and Chelicerata. En: *Comprehensive molecular insect science*. Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.). Elsevier BV, Oxford, 805–842 pp
- Chang ES, Sagi A (2008) Male reproductive hormones. En: *Reproductive biology of crustaceans: case studies of decapod crustaceans*. Mente E (ed). Science Publishers, Enfield, NH, 299–317 pp
- Chapman MR, Kramer DL (1996) Guarded resources: the effect of intruder number on the tactics and success of defenders and intruders. *Anim Behav* 52:83–94
- Chapman T, Arnqvist G, Bangham J, Rowe L (2003) Sexual conflict. *Trends Ecol Evol* 18:41–47

- Charnov EL (1979) Natural selection and sex change in Pandalid shrimp: test of a life history theory. *Am Nat* 113:715–734
- Christy JH (1982) Burrow structure and use in the sand fiddler crab, *Uca pugilator* (Bosc). *Anim Behav* 31:687–694
- Christy JH (1987) Competitive mating, mate choice and mating associations of brachyuran crabs. *B Mar Sci* 41:177–191
- Christy JH (1987) Female choice and the breeding behavior of the fiddler crab, *Uca beebei*. *J Crust Biol* 7:624–635
- Christy JH (2007) Predation and the reproductive behavior of fiddler crabs (Genus *Uca*). En: Duffy J, Thiel M (eds) *Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Oxford University Press, New York, 211–231 pp
- Christy JH, Rittschof D (2011) Deception in visual and chemical communication in crustaceans. En: Breithaupt T, Thiel M (eds) *Chemical communication in crustaceans*. Springer, New York, 313–333 pp
- Christy JH, Salmon M (1991) Comparative studies of reproductive behavior in mantis shrimps and fiddler crabs. *Am Zool* 31:329–337
- Clutton-Brock TH, Parker GA (1992) Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Q Rev Biol* 4:437–456
- Cordero C, Eberhard WG (2005) Interaction between sexually antagonistic selection and mate choice in the evolution of female responses to male traits. *Evol Ecol* 19: 111–122
- Correa C, Thiel M (2003) Population structure and operational sex ratio in the rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea). *J Crust Biol* 23:849–861
- Cowan D, Atema J (1990) Molt staggering and serial monogamy in American lobsters, *Homarus americanus*. *Anim Behav* 39:1199–1206
- Darwin C (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*. London, Murray, 427 pp
- DeKleijn D (1998) Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapods crustaceans. *Invertebr Reprod Dev* 33:263–272

- deRivera CE (2005) Long searches for male-defended breeding burrows allow female fiddler crabs, *Uca crenulata*, to release larvae on time. *Anim Behav* 70:289–297
- Díaz ER (2002) Comunicación sexual en el camarón de roca, *Rhynchocinetes typus* Milne Edwards, 1837. (Crustacea: Decapoda: Rhynchocinetidae). Tesis. Universidad Católica del Norte, Coquimbo.
- Díaz ER, Thiel M (2004) Chemical and visual communication during mate searching in rock shrimp. *Biol Bull* 206:134–143
- Diesel R (1989) Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *J Crust Biol* 9:266–277
- Diesel R (1991) Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). En: Bauer RT, Martin JW (eds) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York, 145–163 pp
- Diesel R, Schubart CD (2007) The social breeding system of the Jamaican bromeliad crab *Metopaulias depressus*. En: Duffy J, Thiel M (eds) *Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Oxford University Press, New York, 365–386 pp
- Dill LM (1978) An energy-based model of optimal feeding–territory size. *Theor Popul Biol* 14:396–429
- Donaldson WE, Adams AE (1989) Ethogram of behavior with emphasis on mating for the tanner crab *Chionoecetes bairdi* Rathbun. *J Crust Biol* 9:37–53
- Duffy JE (2007) Ecology and evolution of eusociality in sponge-dwelling shrimp. En: Duffy J, Thiel M (eds) *Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Oxford University Press, New York, 387–409 pp
- Dunham PJ (1988) Pheromones and behavior in the Crustaceans. En: *Endocrinology of selected invertebrate types*. Laufer H, Downer GH (eds.). New York: AR Liss, 375–392 pp
- Eales AJ (1974) Sex pheromone in the shore crab *Carcinus maenas* and the site of its release from females. *Mar Behav Physiol* 2:345–355

- Eberhard W, Cordero C (1995) Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products—a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends Ecol Evol* 10:493–496
- Ekerholm M, Hallberg E (2005) Primer and short-range releaser pheromone properties of premolt female urine from the shore crab *Carcinus maenas*. *J Chem Ecol* 31:1845–1864
- Ellis L (1995) Dominance and reproductive success among nonhuman animals: a cross-species comparison. *Ethol Sociobiol* 16:257–333
- Elner R, Beninger P (1995) Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: physiological pathways and behavioral plasticity. *J Exp Mar Biol Ecol* 193:93–112
- Elwood RW, Dick JTA (1990) The amorous *Gammarus*: the relationship between precopula duration and size-assortative mating in *G. pulex*. *Anim Behav* 39:828–833
- Elwood RW, Neil S (1992) Assessments and decisions: a study of information gathering by hermit crabs. Chapman & Hall, London, 192 pp
- Elwood R, Gibson J, Neil S (1987) The amorous *Gammarus*: size assortative mating in *G. pulex*. *Anim Behav* 35:1–6
- Emlen ST, Oring LW (1977) Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197:215–223
- Escapa M, Minkoff DR, Perillo GME, Iribarne O (2007) Direct and indirect effects of burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* activities on erosion of southwest Atlantic Sarcocornia-dominated marshes. *Limnol Oceanogr* 52:2340–2349
- Fanjul E, Grela MA, Canepuccia A, Iribarne O (2008) The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuar Coast Shelf S* 79:300–306
- Farias N (2011) Hábitat e historia de vida del cangrejo de las rocas, *Platyxanthus crenulatus* (Decapoda: Platyxanthidae) (Milne Edwards, 1879). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

- Flores A, Negreiros-Fransozo M (1998) External factors determining seasonal breeding in a subtropical population of the shore crab *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) (Brachyura, Grapsidae). *Invertebr Reprod Dev* 34:149–155
- Forbes MRL, Pagola H, Baker RL (1992) Causes of nonrandom pairing by size in the brine shrimp, *Artemia salina*: (Crustatea: Anostraca). *Oecologia* 91:214–219
- Garm A (2004) Revising the definition of the crustacean seta and setal classification systems based on examinations of the mouthpart setae of seven species of decapods. *Zool J Linn Soc Lond* 142:233–252
- Gleeson RA, Adams MA, Smith AB (1984) Characterization of a sex pheromone in the blue crab, *Callinectes sapidus* crustecdysone studies. *J Chem Ecol* 10:913–921
- Goshima S, Koga T, Murai M (1996) Mate acceptance and guarding by male fiddler crabs *Uca tetragonon* (Herbst). *J Exp Mar Biol Ecol* 196:131–143
- Goshima S, Murai M (1988) Mating investment of male fiddler crab, *Uca laceta*. *Anim. Behav.* 36:1249–1251
- Gosselin T, Sainte-Marie B, Bernatchez L (2005) Geographic variation of multiple paternity in wild American lobster, *Homarus americanus*. *Mol Ecol* 14:1517–1525
- Grafen A, Ridley M (1983) A model of mate guarding. *J Theor Biol* 102:549–567
- Griffis RB, Chavez FL (1988) Effects of sediment type on burrows of *Callinassa californiensis* Dana and *C. gigas* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol* 117:239–253
- Hartnoll R (1965) The biology of spider crabs: a comparison of British and Jamaican species. *Crustaceana* 9:1–16
- Hartnoll R (1968) Morphology of the genital ducts in female crabs. *J Linn Soc Zool* 47:279–300
- Hartnoll R (1969) Mating in the Brachyura. *Crustaceana* 16:161–181
- Hartnoll R (2006) Reproductive investment in Brachyura. *Hydrobiologia* 557:31–40
- Hartnoll RG (2000) Evolution of brachyuran mating behavior: relation to the female molting pattern. *Crust Issues* 12:353–389
- Harvey PH, Bradbury JW (1991) Sexual selection. En: *Behavioral ecology: an evolutionary approach*. Krebs JR, Davies NB (eds.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 203–233 pp

- Henmi Y, Murai M (1999) Decalcification of vulvar operculum and mating in the ocypodid crab *Ilyoplax pusilla*. *J Zool* 247:133–137
- Herborg LM, Bentley MG, Clare AS, Last KS (2006) Mating behavior and chemical communication in the invasive Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 329:1–10
- Hinojosa I (2001) Habilidad de apareamientos múltiples de los machos y elección críptica de la hembra en el camarón de roca, *Rhynchocinetes typus* Milne Edwards 1837 (Crustacea: Decapoda: Rhynchocinetidae). Tesis. Universidad Católica del Norte, Coquimbo
- Hinsch GW (1968) Reproductive behavior in the spider crab, *Libinia emarginata* (L.). *Biol Bull* 135:273–278
- Howard RD, Kluge AG (1985) Proximate mechanisms of sexual selection in wood frogs. *Evolution* 39:260–277
- Hughes M (1996) The function of concurrent signals: visual and chemical communication in snapping shrimp. *Anim Behav* 52:247–257
- Hunt J, Bussière L, Jennions M, Brooks R (2004) What is genetic quality? *Trends Ecol Evol* 19:329–333
- Iribarne O, Bortolus A, Botto F (1997) Between-habitat differences in the borrow characteristics and trophic modes in the Southwestern Atlantic borrowing crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Mar Ecol Prog Ser* 155:137–145
- Isacch JP, Costa CSB, Rodríguez-Gallego L, Conde D, Escapa M, Gagliardini DA, Iribarne OO (2006) Association between distribution pattern of plant communities and environmental factors in SW Atlantic saltmarshes. *J Biogeogr* 33:888–902
- Ituarte R, Spivak E, Luppi T (2004) Female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Sci Mar* 68:127–137
- Ituarte RB, Bas C, Luppi TA, Spivak ED (2006) Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic Estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Sci Mar* 70:709–718

- Iyengar VK, Starks BD (2008) Sexual selection in harems: male competition plays a larger role than female choice in an amphipod. *Behav Ecol* 19: 642–649
- Jennings AC, McLay CL, Brockeroff AM (2000) Mating behavior of *Macrophthalmus hirtipes* (Brachyura: Ocypodidae). *Mar Biol* 137:267–278
- Jennions M, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol Rev* 75:21–64
- Jennions MD, Drayton J, Brooks RC, Hunt J (2007) Do female black field crickets *Teleogryllus commodus* benefit from polyandry? *J Evolution Biol* 20:1469–1477
- Jensen P, Orensanz J, Armstrong A (1996) Structure of the female reproductive tract in the Dungeness crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *Biol Bull* 190:336–349
- Jivoff P (1997a) Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* 193:368–380
- Jivoff P (1997b) The relative role of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behav Ecol Sociobiol* 40:175–185
- Johnson P (1980) Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda. Praeger Publishers, New York, 440 pp
- Jones DR, Hartnoll RG (1997) Mate selection and mating behavior in spider crabs. *Estuar Coast Shelf S* 44:185–193
- Jormalainen V (1998) Precopulatory mate guarding in crustaceans: male competitive strategy and intersexual conflict. *Quart Rev Biol* 73:275–304
- Jormalainen V, Merilaita S, Hardling R (2000) Dynamics of intersexual conflict over precopulatory mate guarding in two populations of the isopod *Idotea baltica*. *Anim Behav* 60:85–93
- Jormalainen V (2007) Mating strategies in isopods: from mate monopolization to conflicts. En: *Evolutionary Ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Duffy JE, Thiel M (eds.). Oxford University Press, New York, 167–190 pp
- Jormalainen V, Merilaita S, Hardling R (2000) Dynamics of intersexual conflict over precopulatory mate guarding in two populations of the isopod *Idotea baltica*. *Anim Behav* 60:85–93

- Kamio M, Matsunaga S, Fusetani N (2000) Studies on sex pheromones of the Helmet crab, *Telmessus cheiragonus*. 1. An assay based on precopulatory mate-guarding. *Zool Sci* 17:731–733
- Kamio M, Matsunaga S, Fusetani N (2002) Copulation pheromone in the crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). *Mar Ecol Prog Ser* 234:183–190
- Kamio M, Matsunaga S, Fusetani N (2003) Observation on the Mating Behaviour of the Helmet Crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Cheiragonidae). *J Mar Biol Assoc UK* 83:1007–1013
- Katrak G, Dittmann S, Seuront L (2008) Spatial variation in burrow morphology of the mud shore crab *Helograpsus haswellianus* (Brachyura, Grapsidae) in South Australian saltmarshes. *Mar Freshwater Res* 59:902–911
- Karplus I, Malecha SR, Sagi A (2000) The biology and management of size variation. En: New MB, Valenti WC (eds). *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Blackwell Science, Malden, 259–289 pp
- Kendall MS, Wolcott TG (1999) The influence of male mating history on male-male competition and female choice in mating associations in the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun). *J Exp Mar Biol Ecol* 239:23–32
- Koga T, Backwell P, Jennions M, Christy J (1998) Elevated predation risk changes mating behavior and courtship in the fiddler crab. *Proc R Soc Lond B* 265:1385–1390
- Kokko H, Johnstone RA (2002) Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B* 357:319–330
- Kokko H, Brooks R, McNamara JM, Houston AI (2002) The sexual selection continuum. *Proc R Soc Lond B* 269:1331–1340
- Kokko H (2005) Treat “em mean, keep” em (sometimes) keen: evolution of female preferences for dominant and coercive males. *Evol Ecol* 19:123–135
- Krang A, Baden SP (2004) The ability of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) to follow chemical signals from con-specifics. *J Exp Mar Biol Ecol* 310:195–206
- Kwei EA (1978) Size composition, growth and sexual maturity of *Callinectes latimanus* (Rath) in two Ghanaian lagoons. *Zool J Lin Soc* 64:151–175

- Laufer H, Ahl J (1995) Mating behavior and methyl farnesoate levels in male morphotypes of the spider crab, *Libinia emarginata* (Leach). *J Exp Mar Biol Ecol* 193:15–20
- Lautenschlager A, Brandis D, Storch V (2010) Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. *J Morph* 271:1281–1299
- Lee SY, Seed R (1992) Ecological implications of cheliped size in crabs: some data from *Carcinus maenas* and *Liocarcinus holsatus*. *Mar Ecol Prog Ser* 84:151–160
- Lee T, Yamazaki F (1990) Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *Biol Bull* 178:94–100
- Li HY, Lin FJ, Chan BKK, Chan TY (2008) Burrow morphology and dynamics of mudshrimp in Asian soft shores. *J Zool* 274:301–311
- Lim SSL, Diong CH (2003) Burrow-morphological characters of the fiddler crab, *Uca annulipes* (H. Milne Edwards, 1837) and ecological correlates in a lagoonal beach on Pulau Hantu, Singapore. *Crustaceana* 76:1055–1069
- Lindberg WJ, Stanton G (1989) Resource quality, dispersion and mating prospects for crab occupying bryozoan colonies. *J Exp Mar Biol Ecol* 128:257–282
- López Greco L, Rodríguez E (1998) Size at the onset of sexual maturity in *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Grapsidae, Sesarminae): a critical overall view about the usual criteria for its determination. *Proc Fourth Int Crust Cong* 675–689
- López Greco LS, López GC, Rodríguez EM (1999) Morphology of spermathecae in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Grapsidae, Sesarminae). *J Zool Lond* 249:490–493
- Luppi T, Bas C, Méndez-Casariago A, Albano M, Lancia J, Kittlein M, Rosenthal A, Farias N, Spivak N, Iribarne O (2012) The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgol Mar Res*. DOI 10.1007/s10152-012-0300-9
- Markow TA, Quaid M, Kerr S (1978) Male mating experience and competitive courtship success in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 276:821–822

- McCleese DW, Spraggins RL, Bose AK, Praminik BN (1977) Chemical and behavioral studies of the sex attractant of the lobster (*Homarus americanus*). *Mar Behav Physiol* 4:219–232
- McLain KD (1980) Female choice and the adaptive significance of prolonged copulation in *Nezare viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Psyche* 87:325–336
- McLay C, López Greco L (2011) A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? *Zool Anz* 250:378–406
- Meynard Smith J, Harper D (2003) *Animal signals*. Oxford University Press, New York, 166 pp
- Minouchi S, Goshima S (1998) Effect of male/female size ratio on mating behavior of the hermit crab *Pagurus filholi* (Anomura: Paguridae) under experimental conditions. *J Crust Biol* 18:1
- Morgan S, Goy J, Costlow J (1983) Multiple ovipositions from single mating in the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *J Crust Biol* 3:542–547
- Moriyasu M, Comeau M (1996) Grasping behavior of male snow crab *Chionoecetes opilio* (O. fabricius, 1788) (Decapoda, Majidae). *Crustaceana* 69:211–222
- Morrisey DJ, DeWitt TH, Roper DS, Williamson RB (1999) Variation in the depth and morphology of burrows of the mud crab *Helice crassa* among different types of intertidal sediment in New Zealand. *Mar Ecol Prog Ser* 182:231–242
- Murai M, Goshima S, Henmi Y (1987) Analysis of the mating system of the fiddler crab, *Uca laceta*. *Anim Behav* 35:1334–1342
- Murai M, Koga T, Yong HS (2002) The assessment of female reproductive state during courtship and scramble competition in the fiddler crab, *Uca paradussumieri*. *Behav Ecol Soc* 52:137–142
- Needham HR, Pilditch CA, Lohrer AM, Thrush SF (2010) Habitat dependence in the functional traits of *Austrohelice crassa*, a key bioturbating species. *Mar Ecol Prog Ser* 414:179–193
- Norman GR, Streiner DL (1996) *Bioestadística*. Harcourt, Madrid, 128 pp
- Okazaki RK, Chang ES (1991) Ecdysteroids in the embryos and sera of the crabs, *Cancer magister* and *C. anthonyi*. *Gen Comp Endocr* 81:174–186

- Olivier SR, Escofet A, Penchaszadeh P, Orensanz JM (1972). Estudios ecológicos en la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). I: Las comunidades bentónicas. *An Soc Cient Arg* 93:237–261
- Orensanz J, Parma A, Armstrong D, Armstrong J, Wardrup P (1995) The breeding ecology of *Cancer gracilis* (Crustacea: Decapod: Cancridae) and the mating systems of cancrid crabs. *J Zool* 235:411–437
- Parker G (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev* 45:525–567
- Parker GA (1974) Courtship persistence and female guarding as male time investment strategies. *Behaviour* 48:157–184
- Pitnick S (1996) Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. *Am Nat* 148:57–80
- Pomiankowski A, Iwasa Y (1993) Evolution of multiple sexual preferences by Fisher runaway process of sexual selection. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 253:173–81
- Pope DS (2000) Testing function of fiddler crab claw waving by manipulating social context. *Behav Ecol Sociobiol* 6:432–437
- Popper AN, Salmon M, Horch KW (2001) Acoustic detection and communication by decapod crustaceans. *J Comp Physiol A* 187:83–89
- Raethke N, MacDiarmid AB, Montgomery JC (2004) The role of olfaction during mating in the southern temperate spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Horm Behav* 46:311–318
- Reading KL, Backwell PRY (2007) Can beggars be choosers? Male mate choice in a fiddler crab. *Anim Behav* 74:867–872
- Reta R, Martos P, Perillo GME, Piccolo MC, Ferrante A (2001) Características hidrográficas del estuario de la Laguna de Mar Chiquita. En: Iribarne O (ed) Reserva de Biosfera Mar Chiquita, Editorial Martín, Mar del Plata, Argentina, 31–52 pp
- Richardson AMM (2007) Behavioral Ecology of semiterrestrial crayfish. En: Duffy JE, Thiel M (eds) *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms*, Oxford University Press, 319–338 pp
- Ridley M (1983) *The explanation of organic diversity: the comparative method and adaptations for mating*. Clarendon Press, Oxford, 272 pp

- Ridley M, Thompson DJ (1979) Size and mating in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Z Tierpsychol* 51:380–397
- Ridley M, Thompson DJ (1985) Sexual selection of population dynamics in aquatic Crustacea. En: Behavioral ecology: ecological consequences of adaptive behavior. Sibly RM, Smith RH (eds.). Blackwell Scientific, Oxford 409–422 pp
- Rondeau A, Sainte-Marie B (2001) Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biol Bull* 201:204–217
- Ryan E (1967) Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. The female system. Proceedings of the Symposium on Crustacea, Ernakulam. *J Mar Biol Assoc India* 2:522–544
- Ryan EP (1966) Pheromone: evidence in a decapod crustacean. *Science* 151:340–341
- Sainte-Marie B (2007) Sperm demand and allocation in decapods crustaceans. En: Duffy J, Thiel M (eds) Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms. Oxford University Press, New York, 191–210 pp
- Sainte-Marie B, Gosselin T, Sèvigny JM, Urbani N (2008) The snow crab mating system: opportunity for natural and unnatural selection in a changing environment. *B Mar Sci* 83:131–161
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B (1998) Morphology of the spermatheca, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). *Can J Zool* 76:1589–1604
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B (1999) Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. *Can J Zool* 77:440–450
- Sainte-Marie B, Sèvigny JM, Gauthier Y (1997) Laboratory behavior of adolescent and adult males of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae) mated noncompetitively and competitively with primiparous females. *Can J Fish Aquat Sci* 54:239–248

- Sakurai T (1998) Receptivity of female remating and sperm number in the sperm storage organ in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae). *Res Pop Ecol* 40:167–172
- Sal Moyano MP, Gavio A, Cuartas E (2010) Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgol Mar Res* 64:213–221
- Sal Moyano MP, Gavio MA (2012) Comparison of mating behavior and copulation in male morphotypes of the spider crab *Libinia spinosa* (Brachyura: Majoidea: Epialtidae). *J Crust Biol* 32:31–38
- Salmon M (1983) Courtship, mating systems and sexual selection in decapods. En: Rebach S, Dunham DW (eds) *Studies in Adaptation: The behavior of higher Crustacea*, John Wiley and sons, New York, 143–169 pp
- Salmon M, Horch KW (1972) Acoustic signaling and detection by semi-terrestrial crabs of the family Ocypodidae. En: *Invertebrates. Behavior of marine animals. Current perspectives in research*. Winn HE, Olla BL (eds.). New York: Plenum, 60–96 pp
- Sarker M, Islam S, Uehara T (2009) Artificial insemination and early embryonic development of the mangrove crab *Perisesarma bidens* (De Haan) (Crustacea: Brachyura). *Zool Stud* 48:607–618
- Sastry A (1983) Ecological aspects of reproduction. En: Vernberg F, Vernberg V (eds) *Environmental adaptations*. Academic Press, New York, 179–270 pp
- Sato T, Ashidate M, Jinbo T, Goshima S (2006) Variation of sperm allocation with male size and recovery rate of sperm numbers in spiny king crab *Paralithodes brevipes* *Mar Ecol Prog Ser* 312:189–199
- Sato T, Goshima S (2006) Impacts of male-only fishing and sperm limitation in manipulated populations of an unfishery crab, *Hapalogaster dentata*. *Mar Ecol Prog Ser* 313:193–204
- Sato T, Goshima S (2007) Female choice in response to risk of sperm limitation by the stone crab, *Hapalogaster dentate*. *Anim Behav* 73:331–338
- Scelzo M, Fantucci M, Mantelatto F (2010) Spermatophore and gonopore morphology of the Southwestern-Atlantic hermit crab *Pagurus exilis* (Benedict, 1892) (Anomura, Paguridae). *Zool Stud* 49:421–433

- Scott-Phillips TC (2008) Defining biological communication. *J Evol Biol* 21:387–395
- Seiple W, Salmon M (1982) Comparative social behavior of two grapsid crabs, *Sesarma reticulatum* (Say) and *S. cinerum* (Bosc). *J Exp Mar Biol Ecol* 62:1–24
- Shuster SM (2007) The evolution of crustacean mating systems. En: *Evolutionary Ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Duffy JE, Thiel M (eds.). Oxford University Press, New York, 29–47 pp
- Shuster SM, Wade M (2003) *Mating systems and strategies*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 533 pp
- Sih A (1993) Effects of ecological interactions on forager diets: competition, predation risk, parasitism and prey behavior. En: *Diet Selection*. Hughes RN (ed.). Blackwell, Oxford, 182–211 pp
- Silva PV, Luppi TA, Spivak ED, Anger K (2009) Reproductive traits of an estuarine crab, *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae), in two contrasting habitats. *Sci Mar* 73:117–127
- Smith RL (1984) *Sperm competition and the evolution of animal mating system*. Academic Press. New York, 687 pp
- Snedden WA (1990) Determinants of male mating success in the temperate crayfish *Orconectes rusticus*: chela size and sperm competition. *Behavior* 115:100–113
- Spivak E (2010) The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgol Mar Res* 64:149–154
- Spivak E, Anger K, Luppi TA, Bas C, Ismael D (1994) Distribution and habitat preferences of two grapsoid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgol Meeresunters* 48:59–78
- Spivak ED (1997) Cangrejos estuariales del Atlántico Sudoccidental (25°41'S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Inv Mar Valparaiso* 25:105–120
- Stein RA (1976) Sexual dimorphism in crayfish chelae: functional significance linked to reproductive activities. *Can J Zool* 54:220–221
- Stevens B, Donaldson WE, Haaga JA, Munk JE (1993) Morphometry and maturity of paired tanner crabs, *Chionoectes bairdi*, from shallow and deepwater environments. *Can J Fish Aquat Sci* 50:1504–1516
- Subramoniam T (1993) Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. *Adv Mar Biol* 29:129–214

- Subramoniam T (2000) Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Phys* 125:135–156
- Svard L, Wiklund C (1988) Prolonged mating in the monarch butterfly *Danaus plexippus* and nightfall as a cue for sperm transfer. *Oikos* 52:351–354
- Teytaud AR (1971) The laboratory studies of sex recognition in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. Univ Miami Sea Grant Tech Bull 15, 66 pp
- Thiel M, Duffy J (2007) The behavioral ecology of crustaceans. A primer in taxonomy and functional biology. En: Duffy JE, Thiel M (eds) Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms. Oxford University Press, New York, 3–28 pp
- Thiel M, Hinojosa I (2003) Mating behavior of female rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea) - indication for convenience polyandry and cryptic female choice. *Behav Ecol Sociobiol* 55:113–121
- Thompson EA (1986) Likelihood inference of paternity. *Am J Hum Genet* 39: 285–287
- Thompson G, McLay C (2005) Mating behavior of *Heterozius rotundifrons* (Crustacea: Brachyura: Belliidae): is it a hard or soft shell mater? *Mar Freshwater Res* 56:1107–1116
- Thornhill R (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *Am Nat* 122:765–788
- Thornhill R, Alcock J (1983) The Evolution of Insect Mating Systems. Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 547 pp
- Trivers RL (1972) Parental investment and sexual selection. En: Sexual selection and the descent of man. Campbell B (ed.). London: Aldine Publishing Co, pp 136–179
- Van den Brink A, McLay C (2010) Competing for last place: Mating behavior in a pill-box crab, *Halicarcinus cookii* (Brachyura: Hymenosomatidae). *Zool Anzeiger* 249:21–32
- Wada S, Tanaka K, Goshima S (1999) Precopulatory mate guarding in the hermit crab *Pagurus middendorffii* (Brandt) (Decapoda: Paguridae): effects of population parameters on male guarding duration. *J Exp Mar Biol Ecol* 239:289–298
- Ward PI (1983) Advantages and a disadvantage of large size for male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav Ecol Sociobiol* 14:69–76

- Warner RR (1975) The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animals. *Am Nat* 109:61–82
- Wedell N (2005) Female receptivity in butterflies and moths. *J Exp Biol* 208:3433–3440
- Wellborn GA, Cothran RD (2007) Evolution and ecology of mating behavior in freshwater amphipods. En: *Evolutionary ecology of social and sexual systems: crustaceans as model organisms*. Duffy E, Thiel M (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, 147–166 pp
- Wilber DH (1987) The role of mate guarding in stone crabs. Dissertation. Florida State University, Tallahassee
- Wirtz P, Diesel R (1983) The social structure of *Inachus phalangium*, a spider crab associated with the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Z Tierpsychol* 62:209–234
- Wyatt TD (2010) Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for individuality in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol A* 196:685–700
- Yamamura N (1986) An evolutionarily stable strategy (ES) model of postcopulatory guarding in insects. *Theor Popul Biol* Vol. 29, 48–55 pp
- Yamamura N (1987) A model on correlation between precopulatory guarding and short receptivity to copulation. *J Theor Biol* 127:171–180
- Yamamura N, Jormalainen V (1996) Compromised strategy resolves intersexual conflict over pre-copulatory guarding duration. *Evol Ecol* 10:661–680
- Yamamura N, Tsuji N (1989) Postcopulatory strategy in a finite mating period. *Theor Popul Biol*. Vol. 35, 36–50 pp
- Young NJ, Webster SG, Rees HH (1991) Profile of embryonic ecdsteroids in the decapod crustacean *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebr Reprod Dev* 20:201–212
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall Press, New Jersey, 660 pp
- Zimmerman TL, Felder DL (1991) Reproductive ecology of an intertidal brachyuran crab, *Sesarma* sp. (nr. *reticulatum*), from the Gulf of Mexico. *Biol Bull* 181:387–401