

**Análisis funcional de la capacidad olfativa de *Dysdera ramblae* (Araneae, Dysderidae)**

**Functional analysis of the olfactory capacity of *Dysdera ramblae* (Araneae, Dysderidae)**



Trabajo de Fin de Grado

**Yalenne Vilar López**

Tutorizado por Nuria Macías Hernández (Zoología) y Ángel Acebes Vindel (Instituto Universitario de Tecnologías Biomédicas)

Grado en Biología. Julio 2023



## ÍNDICE

---

Resumen .....	1
Abstract .....	1
Introducción .....	2
<i>El sentido del olfato en artrópodos</i> .....	2
<i>La capacidad olfativa de las arañas</i> .....	4
<i>El género Dysdera en las islas Canarias</i> .....	5
<i>Características propias de la araña de estudio Dysdera ramblae</i> .....	7
Objetivos .....	8
Material y Métodos .....	9
<i>Trabajo de campo: zona de muestreo y colecta de especímenes</i> .....	9
<i>Mantenimiento de los especímenes en el laboratorio</i> .....	9
<i>Funcionamiento del olfactómetro</i> .....	10
<i>Pruebas de olfacción</i> .....	11
<i>Análisis de datos</i> .....	13
Resultados .....	15
<i>Experimento 1: Hojarasca vs. Blanco</i> .....	15
<i>Experimentos 2-6: Presa Isopoda [10-5 - 10-1] vs. Blanco</i> .....	16
<i>Experimentos 7-9: Presa Amphipoda [10-3 - 10-1] vs. Blanco</i> .....	19
<i>Experimento 10: Elección entre presa potencial vs. presa alternativa</i> .....	20
Discusión .....	21
Conclusiones: .....	24
Conclusions: .....	24
Bibliografía .....	25

## Resumen

Los mecanismos olfativos en animales de diferentes filos comparten características comunes tales como la estructura olfativa, la composición de las proteínas receptoras de olores y el comportamiento basado en el olor, aspectos que constituyen un papel fundamental en su supervivencia, reproducción y comportamiento. La mayoría de estudios sobre quimiorrecepción se centran en insectos y crustáceos, existiendo muy poca información sobre las arañas. En este estudio se realizaron una serie de experimentos en un entorno controlado (olfatómetro), para comprender mejor cómo las arañas de la especie *Dysdera ramblae*, especializada en alimentarse de isópodos, responden a una serie de estímulos olfativos relacionados con su alimentación y hábitat. Nuestros resultados sugieren que existe una preferencia olfativa por la hojarasca y que hay diferencias entre adultos y juveniles a la hora de seleccionar entre distintas concentraciones de extracto de su presa potencial (Isopoda). Además, sólo reaccionan a concentraciones elevadas de *Orchestia*.

## Abstract

Olfactory mechanisms in animals of different phylum share common features such as olfactory structure, odor receptor protein composition and odor-based behavior, which play a fundamental role in their survival, reproduction and behavior. Most studies on chemoreception focus on insects and crustaceans, with very little information on spiders. In this study, we conducted a series of experiments in a controlled environment (olfactometer) to better understand how spiders of the species *Dysdera ramblae*, which specialises in feeding on isopods, respond to a series of olfactory stimuli related to their feeding and habitat. Our results suggest that there is an olfactory preference for leaf litter and that there are differences between adults and juveniles when selecting between different concentrations of extract of their potential prey (Isopoda). Furthermore, they only react to high concentrations of *Orchestia*.

# *Introducción*

## *El sentido del olfato en artrópodos*

El sentido del olfato es comúnmente definido como “la capacidad de detección de los agentes químicos que se transportan por el aire (...) y que permite diferenciar sustancias cuya fuente se localiza a cierta distancia del cuerpo” (Moyes & Schulte, 2007). La quimiorrecepción y el procesamiento de las señales químicas del medio ambiente resultan ser procesos biológicos fundamentales, tanto en la interacción con el hábitat como en la reproducción y supervivencia de multitud de organismos (Vizueta *et al.*, 2017).

El Phylum Arthropoda es el taxón animal dominante en lo que a diversidad de especies se refiere, englobando a invertebrados tales como hexápodos, arácnidos, crustáceos y miriápodos (Rodríguez Diego *et al.*, 2009). Se caracteriza por su enorme abundancia y una alta diversidad que representa el 75 % del total actual de especies descritas en el planeta (Gutiérrez-Velázquez *et al.*, 2014) y que están adaptadas a una gran variedad de hábitats, lo que les convierte en una pieza vital para el correcto funcionamiento de las redes tróficas y los ecosistemas (Dicke & Grostal, 2001). Sus características de ubicuidad, tamaño reducido, corto ciclo de vida y facilidad de cría en cautividad los convierten en excelentes candidatos para la manipulación científica (Dicke & Grostal, 2001).

Los mecanismos olfativos de animales pertenecientes a diferentes filos comparten una serie de características en común, abarcando desde la propia estructura olfativa, la composición de las proteínas receptoras de olores, pasando por la organización del sistema nervioso central relacionado con el sentido del olfato, y llegando incluso al comportamiento basado en el olor y la memoria (Eisthen, 2002; Ache & Young, 2005). Dentro de los invertebrados, los insectos y crustáceos son los grupos más estudiados (Moyes & Schulte, 2007). Se han realizado numerosas investigaciones a gran escala sobre la percepción de las señales químicas por parte de los artrópodos, enfocándose principalmente en la búsqueda de pareja o recursos (Dicke & Grostal, 2001).

Durante la última década, hemos presenciado un asombroso avance en el conocimiento del sentido del olfato en insectos, dado que estos brindan modelos ideales para investigar las interacciones entre los genomas animales y el ambiente (De Bruyne & Baker, 2008). Para adaptarse adecuadamente al entorno, los sistemas olfativos periféricos de los insectos deben cumplir dos funciones principales: (1) proporcionar información precisa y rápida sobre señales químicas que desencadenan comportamientos innatos, y (2) mostrar características destacadas

de la amplia gama de compuestos químicos presentes, permitiendo así guiar comportamientos adaptativos (De Bruyne & Baker, 2008).

Los procesos iniciales de quimiorrecepción, que incluyen la detección primaria de señales químicas y la activación de las vías de señalización asociadas, tienen lugar en estructuras especializadas (pelos quimiosensoriales porosos) denominadas sensilas (Steinbrecht, 1997). Estas sensilas suelen localizarse generalmente en las antenas, y algunas veces en apéndices bucales (palpos), y es aquí donde se encuentran las neuronas receptoras olfativas (NROs) encargadas de la detección de los olores. Por lo general, en el interior de las antenas, los axones de las NROs suelen agruparse formando dos nervios por antena, los cuales se fusionan posteriormente para finalmente llegar al cerebro del insecto. La señal identificada revelará información acerca de las condiciones ambientales: calidad y cantidad de olor detectado, si se trata de un único compuesto o una combinación de varios, orientación, intensidad y frecuencia del mismo. Es en este punto donde se evidencia la importancia de poseer diferentes tipos de NROs, ya que posibilitará discernir olores utilizando diversos grados de especialización (Guidobaldi & Guerenstein, 2012).

Dentro del genoma de insectos, existen grupos de proteínas de tamaño moderado que desempeñan un papel crucial en el reconocimiento de señales químicas. Estos grupos se componen de familias multigénicas, siendo las más destacadas las proteínas de unión a olores (OBP) y las proteínas quimiosensoriales (CSP), fundamentales en el procesamiento de la información olfativa en la periferia (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009).

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un modelo genético de gran importancia en la investigación de la percepción quimiosensorial dado que cuenta con diversas familias de quimiorreceptores que detectan olores, sabores, feromonas y estímulos nocivos (Joseph & Carlson, 2015). Todo esto, junto a su reducido tamaño, facilidad de mantenimiento, ciclo de vida corto y sobre todo su potencial genético (genoma completamente secuenciado y con baja redundancia genética), son lo que convierte a esta especie en un organismo modelo en la investigación científica (Franco & Ceriani, 2017). Los genes de los receptores de los olores (genes RO) fueron descubiertos al estudiar el genoma de esta misma especie y destacan por ser una de las familias génicas más extensas relacionadas con las interacciones conductuales de los insectos (De Bruyne & Baker, 2008). Un estudio que sirve de ejemplo en relación a la discriminación y percepción olfativa, es el llevado a cabo por Riveron *et al.*, (2013), en el que se buscaba determinar la aclimatación a las altas temperaturas ambientales en los órganos receptores olfativos de *Drosophila melanogaster*. Actualmente, los estudios en *Drosophila* parecen centrarse principalmente en la bioquímica, genética y fisiología del sistema olfativo

más que en la propia etología del olfato (Laissue & Vosshall, 2008; Martin *et al.*, 2013; Wilson, 2013).

La ecología del comportamiento de la percepción olfativa (principal objetivo de nuestro estudio) se ha investigado en gran medida en especies tales como *Heliothis virescens* (polilla de la familia Noctuidae) y *Popillia japonica* (escarabajo de la familia Scarabaeidae) (Vickers *et al.*, 2001; Nikonov & Leal, 2002). En el primer estudio, se encontró que la estimulación intermitente de un olor natural ocasionaba variaciones en la dinámica de movimiento de los machos según la intensidad y escala del olor. Es importante recalcar que este trabajo se centra en el aspecto feromonal, un proceso muy dependiente de la especie bajo estudio (Vickers *et al.*, 2001). En el segundo caso, se sugirió que los componentes propios de las feromonas son procesados dentro de una sola sensilia antes de su integración en el lóbulo antenal, y que existe una mayor actividad de las NROs cuando se intercalan compuestos volátiles de las plantas de las que se alimenta el escarabajo de estudio (Nikonov & Leal, 2002).

### *La capacidad olfativa de las arañas*

En el caso de los arácnidos como las arañas, es bastante probable que empleen la comunicación química en diversos contextos, aunque nuestro conocimiento actual acerca de las sustancias involucradas, su biosíntesis y cómo y dónde son percibidas es muy escaso. En la última década ha surgido una creciente evidencia que señala la importancia de los sistemas de comunicación química en arañas relacionados con aspectos que abarcan la reproducción, la detección de presas, la evasión de depredadores e incluso la selección de ubicaciones (Uhl, 2012). La mayoría de arañas son depredadoras con una vida solitaria y cuando alcanzan la madurez sexual necesitan encontrar parejas potenciales para reproducirse, periodo en el que el sentido del olfato desempeña un papel crucial en la localización de parejas (Uhl, 2012). Por ejemplo, los machos de la araña australiana de espalda roja, *Latrodectus hasselti*, localizan las telarañas de las hembras vírgenes adultas que se encuentran a una gran distancia, gracias a compuestos químicos liberados en el aire por las redes de éstas últimas (Kasumovic & Andrade, 2004). Además, otros experimentos con la especie *Linyphia triangularis* probaron que cuando se rociaba las telarañas de ejemplares juveniles o hembras apareadas con extractos de hembras adultas, los machos modificaban su comportamiento y evitaban el contacto con estas telarañas modificadas (Schulz & Toft, 1993; Uhl, 2012).

Sin embargo, el olfato de las arañas, como ya hemos comentado, no solo se limita a la selección sexual. El olor de las presas puede suponer una mejora en la eficacia de la búsqueda de alimento, permitiendo a los depredadores localizar más fácilmente a sus presas potenciales (Uhl, 2012). En el estudio de Johnson *et al.*, (2011) a las hembras de la viuda negra

norteamericana, *Latrodectus hesperus*, se les ofreció elegir entre rocas control y rocas que anteriormente albergaron grillos (presas potenciales), y como resultado se observó una mayor preferencia por los microhábitats con señales químicas de los grillos. Otro ejemplo podría ser el trabajo de Persons *et al.*, (2001), centrado en evaluar la distinción de las señales químicas procedentes de *Hogna helluo* (araña lobo depredadora) por parte de la araña lobo *Pardosa milvina*. Esta última detectó y respondió a los estímulos olfativos procedentes de su depredador natural, reduciendo además sus niveles de actividad cuando se colocaban extractos de *Hogna helluo* alimentada con otras *Pardosa*.

Dado que no se han identificado genes específicos para los receptores olfativos (RO), es probable que otras proteínas desempeñen esa función (Vizueta *et al.*, 2018). Los estudios experimentales actuales, mediante RNA-seq, han detectado candidatos prometedores, como son algunos miembros de receptores ionotrópicos (IR), para la función olfativa en los palpos y el primer par de patas de las arañas (Vizueta *et al.*, 2017). Además, aunque existe un conocimiento limitado sobre los órganos y moléculas específicos encargados de la función gustativa y olfativa, se ha observado que miembros de las familias de receptores gustativos (GR) e ionotrópicos (IR) presenta una expresión diferencial en diversas regiones del cuerpo, lo que sugiere que los quimiorreceptores de contacto podrían ser los candidatos más prometedores para desempeñar una función gustativa en arañas (Vizueta *et al.*, 2018).

Todo esto nos permite asegurar que el sentido del olfato juega un papel fundamental en el mundo sensorial de las arañas, a pesar de que nuestro conocimiento sobre las estructuras olfativas subyacentes, la naturaleza de los compuestos químicos involucrados, los receptores implicados y los sitios de producción sea escaso (Uhl, 2012).

### *El género Dysdera en las islas Canarias*

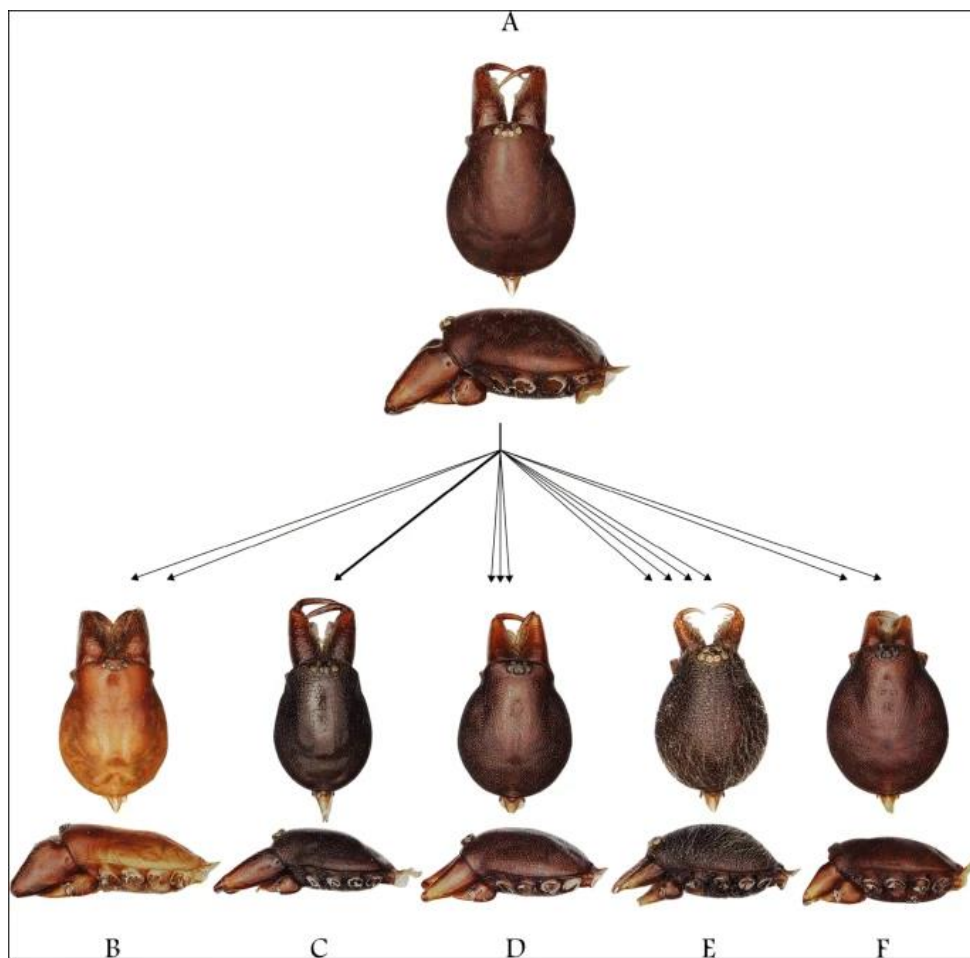
Los archipiélagos macaronésicos, localizados en el océano Atlántico, forman parte de puntos calientes de biodiversidad (Myers *et al.*, 2000), destacando debido a su notable nivel de endemismos y a las dificultades que enfrentan sus propias especies en lo que a términos de conservación se refiere. Entre estos archipiélagos, las islas Canarias se distinguen como uno de los más estudiados debido a la abundancia de especies endémicas, tanto en su fauna como en su flora. En este tipo de ecosistemas, el aislamiento geográfico desempeña un papel fundamental en la diversificación de los organismos, siendo los archipiélagos oceánicos los lugares perfectos para promover en cortos periodos de tiempo procesos evolutivos tales como la radiación adaptativa (Gillespie & Roderick, 2002), así como diversificación eco-morfológica y etológica derivadas de la misma (Macías Hernández, 2011). Un claro ejemplo de dicha

radiación adaptativa es el género de arañas *Dysdera* en las islas Canarias, modelo de estudio del presente trabajo.

Con unas 250 especies registradas, el género *Dysdera* destaca como uno de los grupos de arañas más diversos en la región Paleártica. En los archipiélagos de Salvajes y Cabo Verde se conoce una especie endémica para cada uno de ellos, , en Azores dos y en Madeira once especies (Crespo *et al.*, 2021). Sin embargo, el caso más notable de diversificación se encuentra en las islas Canarias, donde se han documentado unas aproximadamente 50 especies endémicas de *Dysdera* (Macías Hernández *et al.*, 2016).

El género *Dysdera* ha llegado a colonizar gran variedad de hábitats terrestres en Canarias, abarcando desde el intermareal hasta las regiones de mayor altitud, aunque es en la laurisilva donde parecen ser especialmente diversas (Macías-Hernández *et al.*, 2016). En relación con su distribución actual, muchas especies coexisten en la misma zona, llegando a encontrarse dos o tres especies en la misma localidad (Řezáč *et al.*, 2021). En relación a su morfología, son especies que se distinguen con gran facilidad gracias a sus seis ojos, patas anaranjadas y prosoma con una coloración rojiza (Macías Hernández *et al.*, 2009). Además, presentan quelíceros de gran tamaño que muestran una correlación directa entre su morfología, el grado de especialización y la captura de un tipo específico de presa (Řezáč *et al.*, 2008). Las especies con quelíceros no modificados son capaces de alimentarse de una amplia variedad de artrópodos (especies generalistas), mientras que aquellas con quelíceros modificados muestran una preferencia por los isópodos (especies especialistas) y descartan a otras presas potenciales (Macías Hernández, 2011). Estudios previos sugieren la existencia de cuatro tipos de quelíceros que reflejan diferentes especializaciones hacia los isópodos: quelíceros no modificados, quelíceros ligeramente alargados, quelíceros cóncavos y quelíceros con uña plana (Figura 1) (Řezáč *et al.*, 2021). En el caso de las especies con quelíceros modificados existe una relación entre las adaptaciones morfológicas (forma de los quelíceros) y la preferencia conductual por los isópodos, así como la disminución de la capacidad metabólica para manipular otro tipo de presas (Toft & Macías Hernández, 2017, 2021; Rezac *et al.*, 2021). Sin embargo, no se ha descrito ninguna especie de *Dysdera* que presente una dependencia total por isópodos (Toft & Macías Hernández, 2021).





**Figura 1.-** Esquema simplificado de la evolución de la morfología de los quelíceros. (A) quelíceros ligeramente alargados (*Dysdera verneau*); (B) quelíceros no modificados (*Dysdera guayota*); (C) quelíceros alargados (*Dysdera breviseta*); (D) quelíceros cóncavos (*Dysdera cribellata*); (E) quelíceros pequeños (*Dysdera levipes*); (F) uña plana (*Dysdera ramblae*). Figura extraída de Řezáč et al., 2021.

### **Características propias de la araña de estudio *Dysdera ramblae***

La especie modelo de este estudio es *Dysdera ramblae*, endémica de La Gomera, que presenta quelíceros con uña plana dorsoventralmente (Figura 1F), una de las modificaciones más extremas para la especialización en la captura y consumo de isópodos (oniscofagia) (Bellvert *et al.*, 2022). Estudios previos con arañas de este género en Canarias han mostrado que *Dysdera ramblae* presenta una preferencia específica por los isópodos del género *Porcellio*, llegando a aceptar en menor medida a los isópodos del género *Armadillidium* y a rechazar a las moscas del género *Musca* (Toft & Macías Hernández, 2021). Esta especie fue elegida porque es una de las especies de Canarias con un mayor grado de especialización frente a los isópodos, además, de que su colecta resulta más sencilla en comparación a las otras dos especies que presentan dicho tipo de quelíceros.

## *Objetivos*

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo, evaluar la capacidad olfativa de la especie *Dysdera ramblae*, especialista en isópodos, frente a diferentes estímulos olfatorios relacionados con su tipo de alimentación y hábitat natural. Para la consecución del mismo, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la capacidad olfativa de especímenes de arañas juveniles y adultos para seguir rastros u olores específicos en un entorno controlado (olfatómetro).
2. Estudiar si *Dysdera ramblae* muestra una respuesta olfativa hacia su hábitat o nicho ecológico (hojarasca).
3. Determinar el patrón de curvas dosis-respuesta a diferentes concentraciones de estímulos olfatorios (presas potenciales).
4. Evaluar diferencias de discriminación olfativa entre su principal presa potencial (Isopoda) frente a una presa alternativa (Amphipoda).

## Material y Métodos

### Trabajo de campo: zona de muestreo y colecta de especímenes

La localidad donde se realizaron los muestreos para la colecta de ejemplares fue Teselinde (Vallehermoso, La Gomera) (UTM: 28R 275458 3121067). La colecta de ejemplares se realizó el 12 de abril de 2023 y se llevó a cabo por 4 personas. Además de la especie de interés, fue posible observar otras especies del género *Dysdera*: *D. silvatica* y *D. gomerensis*.

Se colectaron un total de 21 especímenes de *D. ramblae* (9 juveniles, 10 hembras y 2 machos) que se localizaban resguardados dentro de sus capullos de seda en lugares tales como la hojarasca o bajo piedras y troncos (Figura 2). Fueron colocados en viales individuales y posteriormente identificados (Figura 3). Además, se recogió una bolsa llena de hojarasca de la zona y ejemplares de isópodos de los géneros *Armadillidium*, *Porcellio* y *Porcellionides*.



**Figura 3.-** Viales individuales utilizados en la recolección de los especímenes.

**Figura 2.-** *Dysdera ramblae* junto a sus huevos en un capullo de seda encontrado bajo una roca.

Posteriormente, el 22 de mayo de 2023, visitamos la localidad de la Pista El Batán (Cruz del Carmen, Anaga) (Tenerife) (UTM: 28R 535320 296800) para la colecta de especímenes de anfípodos terrestres del género *Orchestia* que serían utilizados durante la segunda parte de los experimentos (ver detalles más adelante).

### Mantenimiento de los especímenes en el laboratorio

En el laboratorio, los ejemplares de *D. ramblae* fueron trasladados a unos viales de mayor tamaño que presentaban una capa de yeso en su fondo, sustrato idóneo para mantener la humedad, y unas tapas de gomaespuma que permitían una mayor aireación. De esta forma, nos aseguramos de mantener unas condiciones adecuadas para una mejor conservación de las arañas durante el desarrollo de los experimentos. Los viales fueron numerados del 1 al 21 para poder llevar a cabo un seguimiento de los resultados obtenidos durante las pruebas.

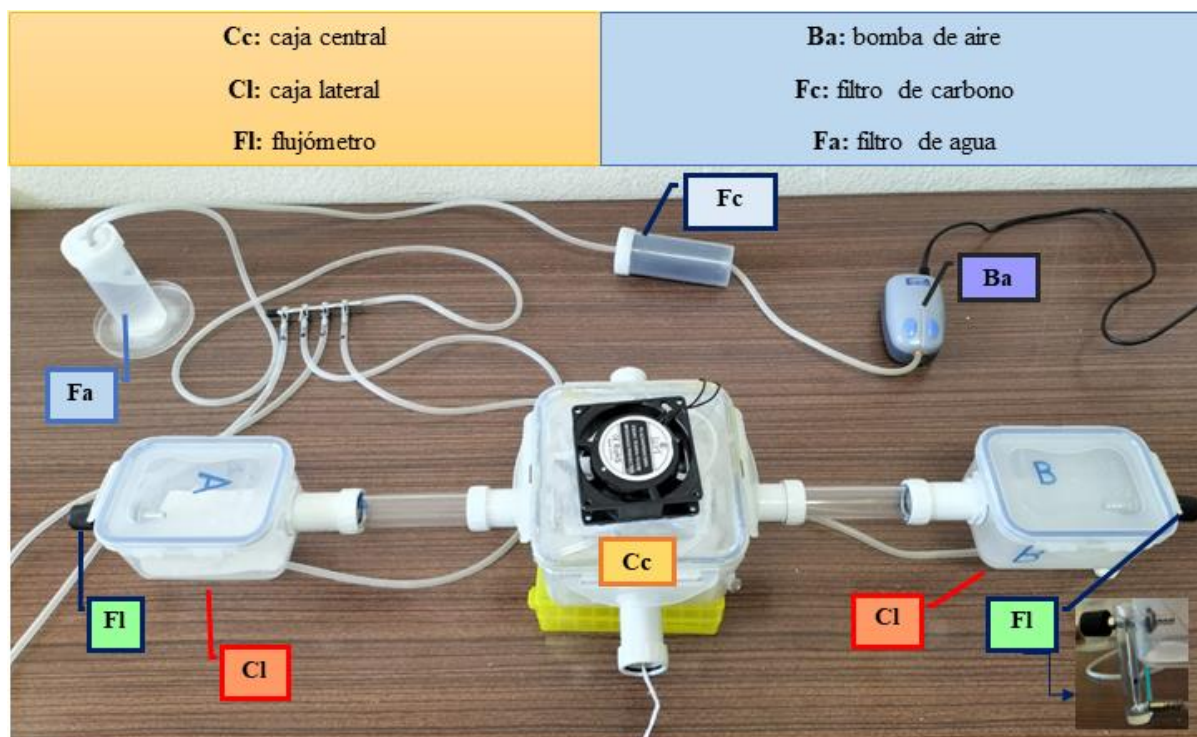
Los isópodos fueron colocados en dos terrarios, que contenían hojarasca recogida en el campo, y separados por género. Además, tanto la hojarasca suelta como la de los terrarios de los isópodos fueron humedecidas cada dos días, al igual que el yeso presente en los recipientes de *D. ramblae*.

Antes de comenzar los experimentos, las arañas se mantuvieron sin alimentar durante aproximadamente una semana con el propósito de que los especímenes no estuvieran saciados y tuvieran mayor capacidad de respuesta. A mitad de los experimentos hubo que alimentarlas con isópodos, dado que rechazaron a los tenebrios (orden Coleoptera) como forma de abastecimiento nutricional.

### *Funcionamiento del olfactómetro*

El olfactómetro es un aparato que sirve para medir la reacción de un organismo, ya sea insecto, artrópodo o incluso reptiles y mamíferos de pequeño tamaño, frente a diversos estímulos olfativos. El sistema consta de tres cámaras interconectadas entre sí, una cámara central, donde se coloca el organismo a estudiar, y dos cámaras laterales con las letras A (estímulo) y B (blanco). La cámara central tenía una base de yeso para evitar que las arañas encontraran huecos donde permanecer durante todo el tiempo destinado a las pruebas de olfacción, es decir, se cubrieron huecos y posibles salidas que no estuviesen relacionadas con el estudio. Las cámaras laterales se encuentran conectadas a la cámara central a través de tubos de metacrilato, y éstas a su vez poseen dos flujómetros que permiten establecer la cantidad y la velocidad del aire que entra al circuito (Figura 4).

El flujo de aire que entra en el sistema lo hace gracias a una pequeña bomba de aire conectada mediante una manguera de silicona a un filtro de carbono para purificar el aire, y posteriormente a un filtro de agua. Este último, actúa como mecanismo de humectación y dirige la corriente de aire hacia un tubo de conexión con las mangueras de silicona que conectan con los flujómetros. En nuestro caso, el flujo de aire elegido para la realización de los experimentos fue de 0,5 L de O<sub>2</sub>/minuto.

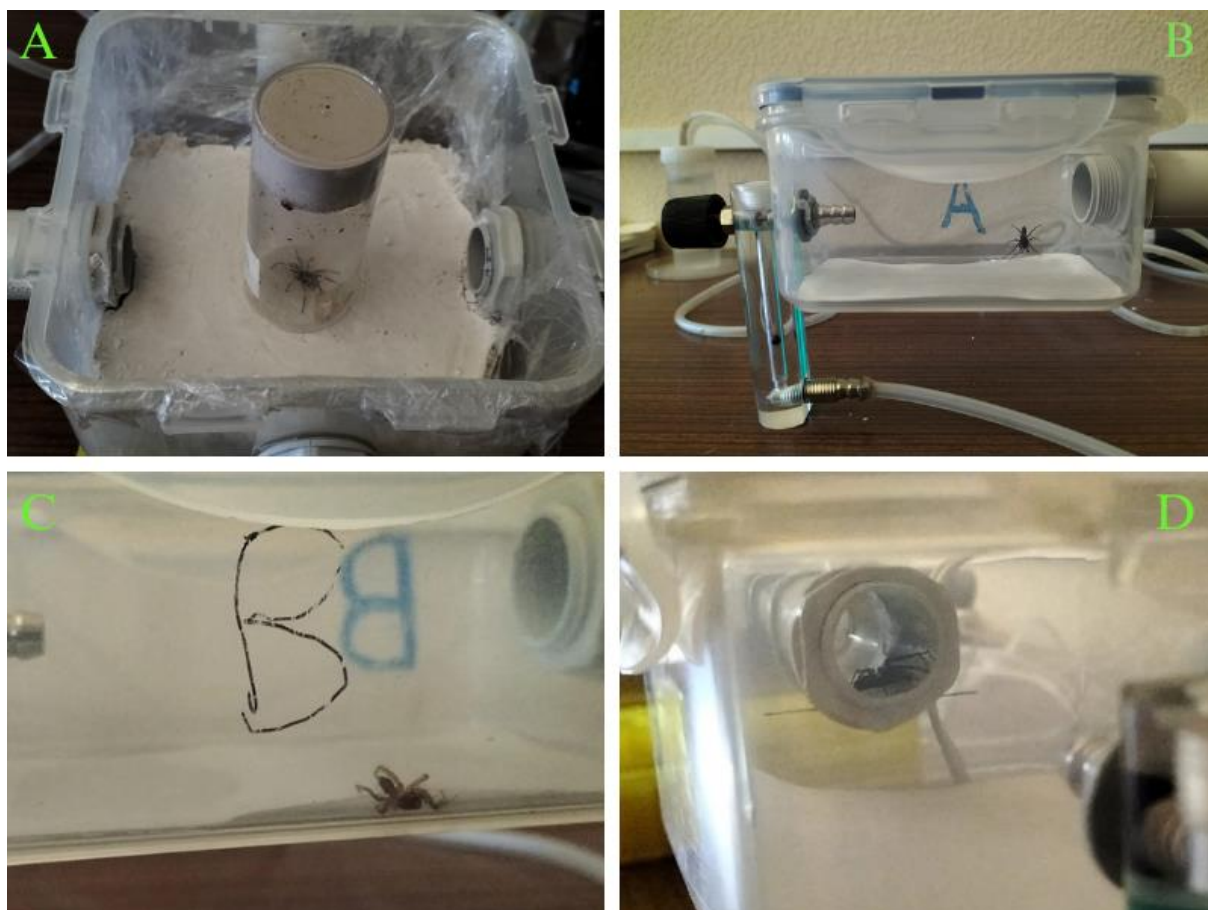


**Figura 4.-** Imagen esquematizada del olfactómetro utilizado durante los experimentos. Material cedido en su totalidad por el departamento de “Ecología y evolución en islas” del IPNA- CSIC.

### *Pruebas de olfacción*

Todas las pruebas se realizaron con las luces del laboratorio apagadas, las persianas bajadas para tratar de imitar lo máximo posible unas condiciones de oscuridad adecuadas a los hábitos nocturnos de la especie. Es importante destacar que los individuos fueron seleccionados al azar para la realización de las pruebas olfativas.

Los experimentos tenían una duración de 35 minutos, de los cuales los cinco primeros se consideraban como un periodo de adaptación y reconocimiento de la zona por parte del animal. El procedimiento es el siguiente: se coloca la araña en la cámara central, se posiciona la tapa y se activa un flujo de aire constante procedente desde ambas cámaras laterales. A continuación, la araña debía decidir si permanecer en el habitáculo principal o dirigirse a alguna de las otras dos cámaras: (A) estímulo olfatorio o (B) blanco (Figura 5). Una vez finalizada la prueba, el olfactómetro era revisado por si había restos fecales y limpiado con agua en caso de ser necesario (se evitó la utilización de cualquier tipo de jabón que pudiese traer partículas odoríferas no deseadas que pudiesen interferir en la prueba olfativa). Se realizaron en total 10 experimentos con especímenes de *D. ramblae*.



**Figura 5.-** Comportamiento de *Dysdera ramblae* en el olfactómetro: A, colocación de uno de los especímenes en la cámara central; B, *Dysdera ramblae* en el interior de la cámara con el estímulo olfatorio; C, *Dysdera ramblae* situándose bajo el papel de filtro en la cámara B y D desplazamiento de *Dysdera ramblae* por los tubos conectores.

El primer experimento tenía como objetivo valorar la etología de la especie cuando debía decidir entre la cámara lateral A, con hojarasca en su interior previamente humedecida para generar un olor similar al que encontramos en su hábitat, frente a la cámara lateral B (control). El blanco o control fue realizado tomando un papel de filtro con las medidas exactas de la cámara y agregándole 400  $\mu$ l de aceite de parafina inodora.

En segundo lugar, los experimentos 2, 3 y 4 fueron realizados de forma que la araña eligiese entre la cámara A, con una concentración determinada de presa, o la cámara B que solo poseía el blanco. Para obtener las concentraciones de presa fue necesario preparar un extracto del isópodo *Porcellionides pruinosus* (14 ejemplares, peso total: 0,28 gr.) utilizando un homogeneizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem junto a 1mL de aceite de parafina (Sigma-Aldrich). A continuación, dicho extracto puro fue diluído 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 en aceite de parafina y conservado en frascos individuales hasta su uso. El día del experimento se tomaban 400  $\mu$ l de la dilución correspondiente y se extendían sobre un papel de filtro que había sido situado previamente en la cámara correspondiente (A). En la otra cámara

(B) se colocaba el blanco. Estos experimentos con distintas concentraciones de presa nos permitieron completar en su totalidad una curva dosis-respuesta del extracto de presa. Es importante destacar que en nuestro estudio se han empleado extractos y diluciones de presas en lugar de colocar al organismo vivo en alguna de las cámaras laterales como forma de anular movimientos de las arañas en respuesta a estímulos de tipo visual, táctil o sonoro que no fueran exclusivamente olfatorios.

En tercer lugar, con el objetivo de comparar la respuesta de las arañas a estímulos olfativos de su presa específica frente a estímulos olfativos procedentes de una presa alternativa, realizamos experimentos con concentraciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$  de extracto de anfípodos terrestres del género *Orchestia*. La selección de estas concentraciones se debe a que fueron a las que mejor respondieron los individuos en las anteriores pruebas con Isopoda. El extracto se obtuvo homogeneizando 10 ejemplares, 0,29 gr. *Orchestia* y diluyendo el extracto puro según las concentraciones indicadas previamente. El experimento fue realizado de la misma forma al explicado anteriormente.

Finalmente, se realizaron los últimos experimentos utilizando tres cámaras laterales del olfactómetro. Los estímulos olfativos entre los que la araña debía escoger se corresponden con: cámara A (dilución de *Porcellio*), cámara B (dilución de *Orchestia*) y cámara C (blanco). Debido al tamaño muestral reducido, la concentración elegida sería 1/10 para el género *Porcellionides* (Isopoda) versus 1/10 para el género *Orchestia* (Amphipoda). Se utilizaron exclusivamente adultos para esta prueba final.

Para evitar posibles problemas de preferencia de lado en *Dysdera ramblae*, las cajas laterales destinadas al estímulo o al blanco eran situadas de forma alterna cada tres o cuatro experimentos (intercambiando la caja derecha por la izquierda y viceversa). Durante la realización de los experimentos (7 semanas), seis individuos juveniles y cinco hembras adultas fallecieron, lo que explica la disminución del tamaño muestral de 21 a 10 especímenes.

### *Análisis de datos*

Los resultados de cada experimento de olfacción fueron registrados en una base de datos Excel, que fue utilizada además para la elaboración de gráficas, representaciones de curvas dosis-respuesta y el cálculo del índice olfativo. El índice olfativo (IO) fue calculado siguiendo la siguiente fórmula:  $(NA - NB) / NT$ ; siendo NA, número de arañas que se desplazaron al compartimento odorífero; NB, número de arañas que se desplazaron a la cámara del blanco; y NT, número total de arañas que se desplazaron hacia la cámara A o la cámara B, es decir, no se

tienen en cuenta a las que permanecieron en la cámara central. Los valores del IO oscilan entre 1 (mayor atracción), 0 (indiferencia) y -1 (repulsión) (Acebes *et al.*, 2011).

Para comparar la existencia de diferencias significativas en los experimentos se utilizó un test de bondad de ajuste chi-cuadrado con la finalidad de aceptar o rechazar la hipótesis nula, siendo esta última  $H_0$ : los dos estímulos son elegidos con la misma frecuencia, es decir, la araña responde de igual forma a la hojarasca y al blanco, al isópodo y al blanco o al anfípodo y al blanco. Para calcular la significancia ( $p < 0,05$ ), en los casos en los que el tamaño muestral era muy reducido, el p-valor se calculó mediante simulaciones, estos análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.3.1 (R Core Team, 2023).

Un detalle importante a destacar es que para nuestros análisis estadísticos se tuvieron en cuenta exclusivamente a las arañas que mostraron un desplazamiento dentro del olfactómetro, es decir, aquellas que eligieron la cámara A o B.



## Resultados

A continuación, se muestran los resultados de los diferentes experimentos realizados, en los que se agrupan el total de individuos, es decir, sin tener en cuenta el estadio de desarrollo (juveniles o adultos (Tabla 1)).

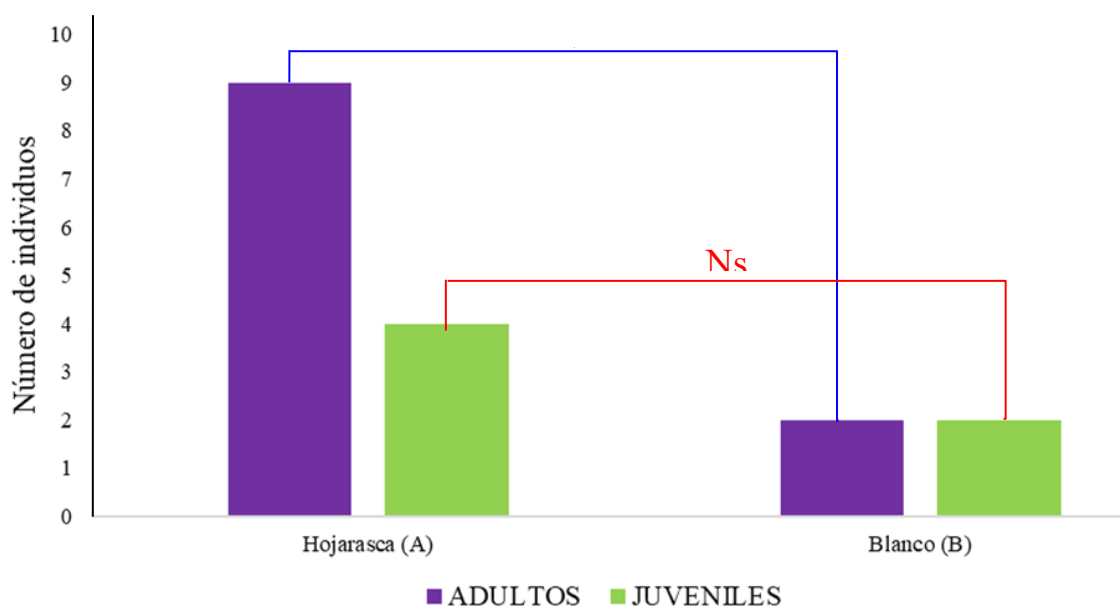
**Tabla 1-** Resultados obtenidos en los experimentos de olfacción. Experimento 1 (Hojarasca, verde), experimentos 2-6 (Isopoda, azul) y experimentos 7-9 (Amphipoda, rosa). NA, número de arañas que seleccionaron la caja con estímulo (hojarasca, presa), NB, número de arañas que seleccionaron la caja sin estímulo (blanco), \*: test de chi-cuadrado con p-valor obtenido con simulaciones.

	N <sub>TOTAL</sub>	NA (Estímulo)	N <sub>B</sub> (Blanco)	X <sub>2</sub> (Chi-cuadrado)	P-valor
<b>EXP. 1</b>	20	13	4	4.7647	0.02905
<b>EXP. 2 (10<sup>-5</sup>)</b>	16	6	7	0.076923	0.7815
<b>EXP. 3 (10<sup>-4</sup>)</b>	17	5	10	1.6667	0.1967
<b>EXP. 4 (10<sup>-3</sup>)</b>	18	6	5	0.090909	0.763
<b>EXP. 5 (10<sup>-2</sup>)</b>	17	11	4	3.2667	0.0707
<b>EXP. 6 (10<sup>-1</sup>)</b>	17	9	5	1.1429	0.285
<b>EXP. 7 (10<sup>-3</sup>)</b>	12	1	5	2.6667	0.2294*
<b>EXP. 8 (10<sup>-2</sup>)</b>	11	3	7	1.6	0.2059
<b>EXP. 9 (10<sup>-1</sup>)</b>	11	5	2	1.2857	0.4633*

### Experimento 1: Hojarasca vs. Blanco

En esta primera prueba, 13 de las 20 arañas (65%), se desplazaron a la cámara A, donde se hallaba la hojarasca fresca (Figura 6; Tabla 1), 4 arañas (20%) eligieron la cámara B, donde se encontraba el papel con parafina (blanco) (Tabla 1), y por último, 3 arañas (15%) permanecieron en la cámara central. Los resultados para el total de los ejemplares (Tabla 1) muestran un p-valor menor que el nivel de significación (0,05), por lo que es posible rechazar la hipótesis nula.

Por otro lado, cuando diferenciamos entre individuos juveniles\* ( $X^2 = 0.66667$ ,  $p = 0.6777$ ) y adultos ( $X^2 = 4.4545$ ,  $p = 0.03481$ ) obtenemos que los resultados observados para juveniles no presentan el nivel de significación adecuado como para rechazar la hipótesis nula (Figura 6).



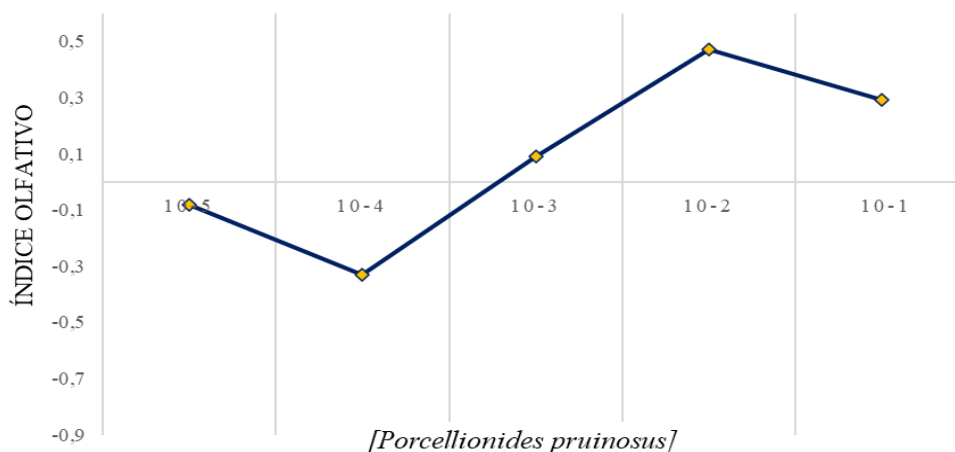
**Figura 6.-** Representación comparativa del número de adultos y juveniles que escogieron entre el estímulo olfativo hojarasca y el blanco. Siendo \*, existe significancia; Ns, no existe significancia.

Durante el experimento se pudo observar el siguiente comportamiento general: tras ser colocadas en la cámara central y transcurrido un periodo de adecuación de cinco minutos, tiempo en el que las arañas exploraban la entrada de los tubos interconectados con las cámaras A y B y el espacio de este habitáculo inicial, seleccionaban una de las cámaras olfativas y entraban en ella. El tiempo de respuesta medio para la elección del estímulo olfativo rondó los 10-15 minutos tras el comienzo del experimento. Por otro lado, hubo cuatro casos que se diferenciaron del resto, pues tras entrar en el tubo B o en la propia cámara de éste, cambiaron su decisión y entraron en la cámara con la hojarasca. Es necesario resaltar que tras haber escogido la cámara con hojarasca, ninguno de los individuos regresó a la cámara central.

#### *Experimentos 2-6: Presa Isopoda [ $10^{-5}$ - $10^{-1}$ ] vs. Blanco*

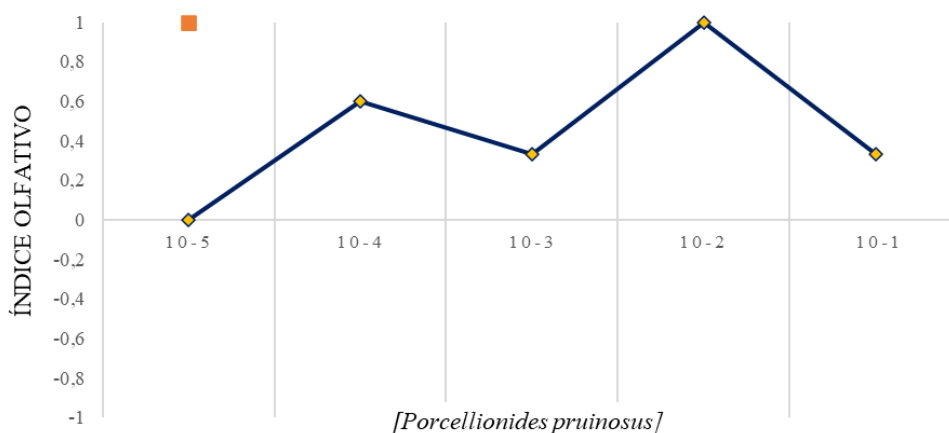
Estos experimentos se realizaron con el fin de obtener una curva dosis-respuesta y determinar a qué concentración de estímulo de presa las arañas responden mayoritariamente.

En primer lugar, se presenta la curva dosis-respuesta teniendo en cuenta el total de individuos (Figura 7). Siendo los índices olfativos (IO) para las diferentes concentraciones los siguientes:  $-0.08 (10^{-5})$ ,  $-0.33 (10^{-4})$ ,  $0.09 (10^{-3})$ ,  $0.47 (10^{-2})$  y  $0.29 (10^{-1})$ . Se observa como el mayor valor (mayor preferencia olfativa) se corresponde con la concentración  $10^{-2}$  y el menor valor (menor preferencia olfativa) se corresponde con  $10^{-4}$ .



**Figura 7.-** Curva dosis-respuesta que muestra el índice olfativo a las diferentes diluciones del género *Porcellio* (Isopoda) por parte del **número total de individuos** (adultos y juveniles).

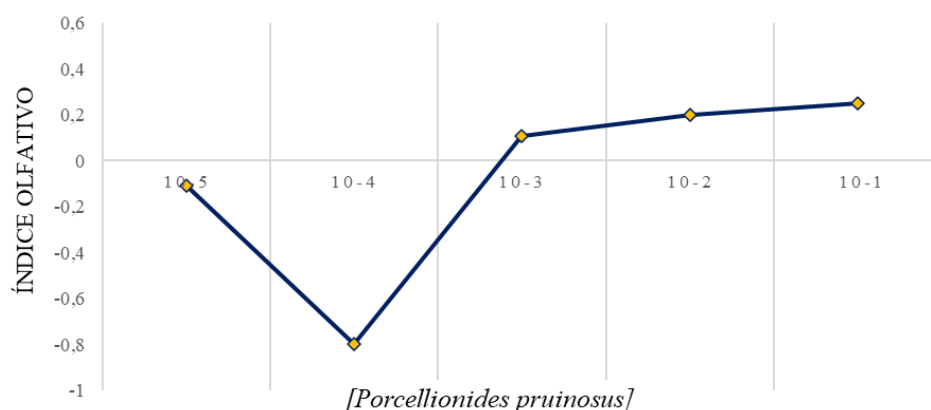
En segundo lugar, tuvimos en cuenta el estadio de maduración (individuos juveniles y adultos). En el caso de los juveniles los IO fueron los siguientes: 0 ( $10^{-5}$ ), 0.60 ( $10^{-4}$ ), 0.33 ( $10^{-3}$ ), 1 ( $10^{-2}$ ) y 0.33 ( $10^{-1}$ ). Observamos que, para todas las concentraciones, exceptuando a  $10^{-5}$  (indiferencia), se muestra una inclinación hacia el estímulo olfativo, siendo  $10^{-2}$  el caso más destacado.



**Figura 8.-** Curva dosis-respuesta que muestra el índice olfativo a las diferentes diluciones del género *Porcellio* (Isopoda) por parte de los **individuos juveniles**.

En el caso de los individuos adultos, los IO para cada concentración fueron los siguientes: -0.11 ( $10^{-5}$ ), -0.80 ( $10^{-4}$ ), 0.11 ( $10^{-3}$ ), 0.20 ( $10^{-2}$ ) y 0.25 ( $10^{-1}$ ). Destacando una mayor preferencia a la concentración  $10^{-1}$  y una menor preferencia a  $10^{-4}$ , datos muy diferentes a los observados en juveniles, dado que presentan indiferencia o repulsión por los valores de las concentraciones más bajas.

## RESULTADOS



**Figura 9.-** Curva dosis-respuesta que muestra el índice olfativo a las diferentes diluciones del género *Porcellio* (Isopoda) por parte de los **individuos adultos**.

Los valores de chi cuadrado y p-valores obtenidos con los análisis estadísticos del total de individuos se muestran en la Tabla 1, de los juveniles (Tabla 2) y de los adultos (Tabla 3). Siendo todos valores no significativos con la única excepción en la concentración de  $10^{-4}$  de los adultos (Tabla 3).

**Tabla 2-** Valores para los **individuos juveniles** de la prueba chi cuadrado (bondad de ajuste) con p-valor obtenido con simulaciones. N<sub>TOTAL</sub>, número total de individuos

	<i>N<sub>TOTAL</sub></i>	<i>X<sub>2</sub> (Chi-cuadrado)</i>	<b>P-valor</b>
<b>EXP. 2 (10<sup>-5</sup>)</b>	5	0	1
<b>EXP. 3 (10<sup>-4</sup>)</b>	6	1.8	0.3858
<b>EXP. 4 (10<sup>-3</sup>)</b>	7	0.33333	1
<b>EXP. 5 (10<sup>-2</sup>)</b>	6	5	0.05147
<b>EXP. 6 (10<sup>-1</sup>)</b>	6	0.66667	0.6712

**Tabla 3-** Valores para los **individuos adultos** de la prueba chi cuadrado (bondad de ajuste). \*, p-valor obtenido con simulaciones. N<sub>TOTAL</sub>, número total de individuos

	<i>N<sub>TOTAL</sub></i>	<i>X<sub>2</sub> (Chi-cuadrado)</i>	<b>P-valor</b>
<b>EXP. 2 (10<sup>-5</sup>)</b>	11	0.11111	1*
<b>EXP. 3 (10<sup>-4</sup>)</b>	11	6.4	0.01141
<b>EXP. 4 (10<sup>-3</sup>)</b>	11	0	1*
<b>EXP. 5 (10<sup>-2</sup>)</b>	11	0.4	0.5271
<b>EXP. 6 (10<sup>-1</sup>)</b>	11	0.5	0.7326*

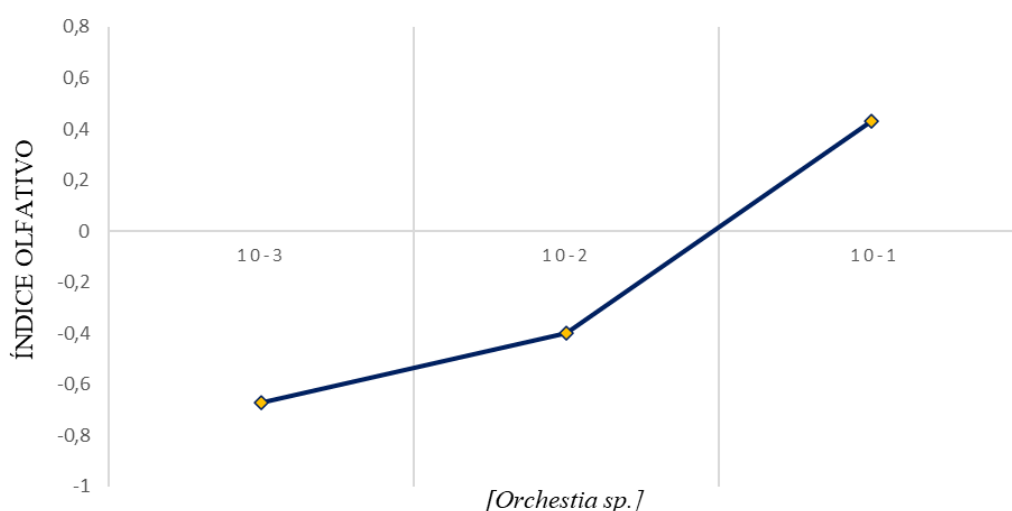
A diferencia del comportamiento observado durante el experimento de hojarasca, las arañas tardaron de media entre 15-17 minutos, en elegir una de las cámaras laterales en las

concentraciones más bajas ( $10^{-5}$  y  $10^{-4}$ ), y entre 13-15 minutos en las concentraciones mayores ( $10^{-3}$  a  $10^{-1}$ ). Además, en la elección de la concentración de Isopoda (A) permanecieron más tiempo en el interior del tubo que conectaba con dicha cámara. Una similitud destacable es el hecho de que nuevamente, tras haber entrado en la cámara A, no retrocedían a la cámara central.

**Experimentos 7-9: Presa Amphipoda [ $10^{-3}$  -  $10^{-1}$ ] vs. Blanco**

La curva dosis-respuesta se obtuvo teniendo en cuenta el total de individuos (Figura 10), dado que el tamaño muestral de los juveniles era muy reducido. Los índices olfativos obtenidos son los siguientes: -0.67 ( $10^{-3}$ ), -0.40 ( $10^{-2}$ ) y 0.43 ( $10^{-1}$ ). Se observa como el mayor valor (mayor preferencia olfativa) se corresponde con la concentración  $10^{-1}$ , y el menor valor (menor preferencia olfativa) se corresponde con  $10^{-3}$ , es decir, existe una tendencia positiva de la menor a la mayor concentración.

Los valores obtenidos con el test de chi-cuadrado y p-valor para el total se muestran en la Tabla 1.



**Figura 10.-** Curva dosis-respuesta que muestra el índice olfativo a las diferentes diluciones del género *Orchestia* (Amphipoda) por parte del **número total de individuos**.

De igual forma que con los experimentos anteriores, el tiempo medio de elección fue similar (entre 10-15 minutos). Sin embargo, a las diferentes concentraciones de Amphipoda diversas arañas, aunque entraron en un inicio en la cámara A ( $10^{-5}$  y  $10^{-4}$ ), modificaron su elección y se dirigieron a la cámara B, o a la zona central.

**Experimento 10: Elección entre presa potencial vs. presa alternativa**

En esta última prueba, centrada exclusivamente en los individuos adultos, se eligió como concentración para ambas diluciones de presa el valor de  $10^{-1}$ , ya que la mayor respuesta olfativa según los valores del IO fue a dicha concentración tanto para Isopoda como para

*Orchestia*. El reducido tamaño muestral no nos permitió realizar ningún análisis estadístico que resultara fiable.

Los resultados fueron los siguientes: 1 de las 7 arañas (14.28%) se desplazó a la cámara A (Isopoda), 2 arañas (28.57%) eligieron la cámara B (blanco), 1 araña (14.28%) eligió la concentración de Amphipoda, y por último 3 arañas (42.85%) permanecieron en la cámara central.

## Discusión

Durante mucho tiempo ha existido un gran desconocimiento en torno al sentido del olfato en las arañas, con la realización de este trabajo hemos analizado nuevos datos comportamentales para tratar de entender un poco más esta forma de quimiorrecepción en estos arácnidos. Hasta ahora, el conocimiento de las moléculas específicas implicadas en la quimiorrecepción en los quelicerados se ha obtenido únicamente mediante el análisis comparativo de las secuencias genómicas, llegando a visualizar la presencia de receptores ionotrópicos (IR) y gustativos (GR), siendo los IR los que presentan genes responsables del olfato en los artrópodos no neópteros (*Archaeognatha* y *Zygentoma*) (Vizueta *et al.*, 2017). Además, en una especie similar (*Dysdera silvatica*) se han encontrado genes de las principales familias de quimiorreceptores (GR e IR) codificados en el genoma (Escuer *et al.*, 2022).

En primer lugar, intentamos responder a la pregunta ya descrita en los objetivos: ¿será *Dysdera ramblae* capaz de detectar el estímulo olfativo relacionado con su hábitat? Nuestros datos sugieren que dicha especie muestra una respuesta olfativa preferente por la hojarasca, compuesta por una combinación de tierra, ramas y hojas propia de su ecosistema habitual. No solo se observa una diferencia significativa al tener en cuenta a todos los individuos que prefieren este olor frente al blanco, sino que también es importante destacar la rápida elección por dicho estímulo. Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo de nuestro equipo llevado a cabo con una especie similar a la estudiada (*Dysdera vernaui*) que también mostró una atracción olfativa por la hojarasca (González Batista, 2018). Este experimento con el estímulo hacia su tipo de hábitat se diferencia de otros estudios relacionados con el sistema olfativo en arañas, ya que generalmente las investigaciones de este ámbito son investigaciones del comportamiento de diversas especies frente a tipos de presas (Jackson *et al.*, 2005), depredadores (Persons *et al.*, 2001) y la selección de parejas de apareamiento (Jackson & Cross, 2011).

Por otro lado, cuando diferenciamos entre juveniles y adultos estos últimos parecen ser capaces de discernir de forma más eficiente cuál de las cámaras laterales se corresponde con el estímulo olfativo (hojarasca). Además, los únicos tres individuos que permanecieron en la cámara central durante este experimento fueron todos juveniles. Una posible explicación a esta diferencia podría ser que los adultos tengan los órganos o estructuras relacionadas con la quimiorrecepción mejor desarrollados que los estadios juveniles. Desafortunadamente, no existen estudios previos que analicen las diferencias entre la anatomía del sistema olfativo de juveniles frente a adultos, por lo que se trata solo de una suposición.

En segundo lugar, en relación con los experimentos de Isopoda (presa preferente de *D. ramblae*) observamos que, teniendo en cuenta el total de individuos en la curva dosis-respuesta, la concentración a la que muestran una mayor respuesta olfativa es a  $10^{-2}$ , una de las concentraciones más altas de nuestros experimentos. Sin embargo, al diferenciar entre juveniles y adultos, detectamos un comportamiento diferente entre ambos: los juveniles parecen tener una preferencia por  $10^{-2}$ , seguido de cerca por  $10^{-4}$ , mientras que los adultos muestran menor atracción en este último valor y muestran un comportamiento preferente a la concentración de  $10^{-1}$ . Los olores volátiles de las presas aumentan considerablemente la eficacia de la búsqueda de alimento (Uhl, 2012) y es mediante la presencia de pelos quimiosensibles especializados, ubicados sobre todo en los palpos y el primer par de patas, cómo las arañas tienen la capacidad de percibir tanto compuestos volátiles como no volátiles (Vizueta *et al.*, 2017). Estudios sobre selección de presas realizados con la araña saltadora *Evarcha culicivora*, indican que identificó a sus presas, los mosquitos recién alimentados de sangre, utilizando únicamente el olfato (Jackson *et al.*, 2005). Nuestros resultados sugieren el reconocimiento de su presa preferente por parte de *D. ramblae*, ya que ésta parece preferir las concentraciones que presentan una mayor cantidad del olor del isópodo.

En tercer lugar, al analizar los datos recopilados con los experimentos de Amphipoda, observamos de nuevo como la mayor preferencia olfativa se da en la concentración más alta  $10^{-1}$ , y dado que la mayor parte de los individuos son adultos (la gran mortandad de los juveniles disminuyó notablemente su número), los resultados se asemejan con lo observado en el caso de Isopoda. Sin embargo, parece que con este tipo de presa, la cual es mucho menos frecuente en la dieta de *D. ramblae*, se necesita una concentración muy elevada para permitir la preferencia olfativa, dado que en las concentraciones  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  las respuestas parecen mostrar cierta indiferencia o rechazo. Nuestros resultados contrastan con los encontrados en el estudio previo realizado con la depredadora generalista *Dysdera verneui*, la cual mostró cierta repulsión por una concentración muy elevada de Isopoda (González Batista, 2018). Este comportamiento puede deberse a que *D. verneui* es una especie generalista y no presenta preferencia por los isópodos, así, una alta concentración de dicho estímulo puede provocar una repulsión hacia el mismo, al contrario que lo observado en la especie *D. ramblae* (especialista en isópodos). Todo esto podría deberse a que existen arañas depredadoras especialistas que responden de manera distintiva a las señales químicas olfativas provenientes de sus presas específicas (Uhl, 2012), como ocurre en un estudio con una araña saltadora (*Habrocestum pulex*) que prefiere las zonas impregnadas con la señal proveniente de sus presas las hormigas (Allan *et al.*, 1996). Además, existen otros estudios que evidencian que incluso una araña clasificada como depredadora



generalista (*Hogna helluo*) es capaz de establecer conexiones entre señales químicas específicas y presas particulares (Persons & Rypstra, 2000; Uhl, 2012).

Finalmente, aunque el tamaño muestral era muy reducido se intentó comparar las respuestas frente a Isopoda y Amphipoda en el mismo olfactómetro. No obstante, no observamos diferencias significativas para ninguno de los olores y los resultados fueron muy similares para ambos tipos de presa, es decir, el tamaño muestral imposibilitó obtener unas conclusiones adecuadas al ámbito olfativo especialista de la especie.

Es importante remarcar que el tamaño muestral fue disminuyendo debido a la alta mortalidad de los individuos, es por ello, que para futuros estudios sería interesante repetir los experimentos con un mayor número de ejemplares para poder tener una mayor robustez estadística. Asimismo, sería relevante analizar los diferentes estadios de juveniles, machos y hembras por separado, para entender si los diferentes grados de maduración sexual pueden influir en la recepción de estímulos olfativos. Se podrían también realizar pruebas similares a las ya mostradas pero utilizando una especie generalista de *Dysdera* con una menor atracción por la alimentación con isópodos.

Finalmente, nuestros resultados invitan a explorar más a fondo los mecanismos subyacentes como son los receptores olfativos y los compuestos químicos desencadenantes de las respuestas comportamentales mediante la inclusión de datos genómicos

## *Conclusiones:*

1. Nuestros resultados respaldan la hipótesis de que las arañas son capaces de utilizar el sistema olfativo para identificar y localizar tanto su hábitat como sus presas habituales. Se observó que la mayoría de los individuos de *D. ramblae* mostraron una preferencia olfativa hacia la hojarasca.
2. En relación a su presa potencial (Isopoda) los individuos de *D. ramblae* mostraron una preferencia por las concentraciones más elevadas ( $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ ). En el caso de la presa alternativa (Amphipoda) mostraron una reacción positiva en la concentración más elevada ( $10^{-1}$ ).
3. Teniendo en cuenta el estadio de desarrollo, se observó que los adultos consiguen diferenciar entre las concentraciones bajas y elevadas, mientras que los juveniles no realizan tales distinciones, llegando a verse atraídos de forma similar por una concentración elevada ( $10^{-2}$ ) y una concentración mínima ( $10^{-4}$ ).

## *Conclusions:*

1. Our results support the hypothesis that spiders are able to use the olfactory system to identify and locate both their habitat and their usual prey. We observed that most individuals of *D. ramblae* showed an olfactory preference for leaf litter.
2. In relation to their potential prey (Isopoda) *D. ramblae* individuals showed a preference for the higher concentrations ( $10^{-2}$  and  $10^{-1}$ ). In the case of the alternative prey (Amphipoda) they showed a positive reaction to the highest concentration ( $10^{-1}$ ).
3. Taking into account the developmental stage, it was observed that adults are able to differentiate between low and high concentrations, while juveniles do not make such distinctions, being similarly attracted to high ( $10^{-2}$ ) and low ( $10^{-4}$ ) concentrations.

## Bibliografía

- Acebes, A., Martín-Peña, A., Chevalier, V., & Ferrús, A. (2011). Synapse loss in olfactory local interneurons modifies perception. *Journal of Neuroscience*, 31(8), 2734-2745. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5046-10.2011>
- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417-430. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.022>
- Allan, R. A., Elgar, M. A., & Capon, R. J. (1996). Exploitation of an ant chemical alarm signal by the zodariid spider *Habronestes bradleyi* Walckenaer. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1366), 69-73. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0012>
- Bellvert, A., Roca-Cusachs, M., Tonzo, V., Arnedo, M. A., & Kaliontzopoulou, A. (2022). The vitruvian spider: Segmenting and integrating over different body parts to describe ecophenotypic variation. *Journal of Morphology*, 283(11), 1425-1438. <https://doi.org/10.1002/jmor.21516>
- Crespo, L. C., Silva, I., Enguádanos, A., Cardoso, P., & Arnedo, M. A. (2021). Integrative taxonomic revision of the woodlouse-hunter spider genus *Dysdera* (Araneae: Dysderidae) in the Madeira archipelago with notes on its conservation status. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 192(2), 356-415. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa089>
- De Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 882-897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- Dicke, M., & Grostal, P. (2001). Chemical detection of natural enemies by arthropods: An ecological perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 1-23. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.113951>
- Eisthen, H. L. (2002). Why are olfactory systems of different animals so similar? *Brain, Behavior and Evolution*, 59(5-6), 273-293. <https://doi.org/10.1159/000063564>
- Escuer, P., Pisarenco, V. A., Fernández-Ruiz, A. A., Vizueta, J., Sánchez-Herrero, J. F., Arnedo, M. A., Sánchez-Gracia, A., & Rozas, J. (2022). The chromosome-scale assembly of the canary islands endemic spider *Dysdera silvatica* (Arachnida, Araneae) sheds light on the origin and genome structure of chemoreceptor gene families in chelicerates. *Molecular Ecology Resources*, 22(1), 375-390. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13471>
- Franco, D. L., & Ceriani, M. F. (2017). *Drosophila melanogaster*, un versátil organismo modelo. *Ciencia hoy*, 27(157), 13-17
- Gillespie, R. G., & Roderick, G. K. (2002). Arthropods on islands: Colonization, Speciation, and Conservation. *Annual Review of Entomology*, 47(1), 595-632. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145244>
- González Batista, J. (2018). Evaluación funcional de la capacidad olfativa de la araña *Dysdera verneaui*. Universidad de La Laguna.
- Guidobaldi, F., & Guerenstein, P. (2012). El sistema olfativo de los insectos. *National Scientific and Technical Research Council. CONICET.CICYTTP. Centro De Investigaciones Científicas Y Transferencia Tecnológica a La Producción*, 46-71
- Gutiérrez-Velázquez, A., & Reyes-Castillo, P. (2014). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento. *Acta zoológica mexicana*, 30(3), 752-755.
- Jackson, R. R., & Cross, F. R. (2011). Olfaction-based mate-odor identification by jumping spiders from the genus *Portia*. *The Journal of Arachnology*, 39(3), 439-443.

- Jackson, R. R., Nelson, X. J., & Sune, G. O. (2005). A spider that feeds indirectly on vertebrate blood by choosing female mosquitoes as prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15155-15160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507398102>
- Johnson, A., Revis, O., & Johnson, J. C. (2011). Chemical prey cues influence the urban microhabitat preferences of western black widow spiders, *Latrodectus hesperus*. *The Journal of Arachnology*, 39(3), 449-453. <https://doi.org/10.1636/Hi11-19.1>
- Joseph, R. M., & Carlson, J. R. (2015). Drosophila chemoreceptors: A molecular interface between the chemical world and the brain. *Trends in Genetics*, 31(12), 683-695. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.005>
- Kasumovic, M. M., & Andrade, M. C. (2004). Discrimination of airborne pheromones by mate-searching male western black widow spiders (*Latrodectus hesperus*): Species- and population-specific responses. *Canadian Journal of Zoology*, 82(7), 1027-1034. <https://doi.org/10.1139/z04-081>
- Laiusue, P. P., & Vosshall, L. B. (2008). The olfactory sensory map in drosophila. *Brain Development in Drosophila Melanogaster*. Springer New York.
- Macías Hernández, N. E. (2011). Bases filogeográficas Y morfológicas de la diversificación del género *Dysdera* (Araneae, Dysderidae) en Canarias. Universidad de La Laguna (Canary Islands, Spain).
- Macías Hernández, N. E., Arnedo Lombarte, M. A., & Oromí Masoliver, P. (2009). Tras los pasos de un colonizador de ocho patas: Evolución de las arañas del género *Dysdera* en Canarias. *El Indiferente: Centro De Educación Ambiental Municipal*, (20), 44-51.
- Macias-Hernandez, N., de la Cruz López, S., Roca-Cusachs, M., Oromí, P., & Arnedo, M. A. (2016). A geographical distribution database of the genus *Dysdera* in the Canary Islands (Araneae, Dysderidae). *ZooKeys*, (625), 11-23. <https://doi.org/10.3897/zookeys.625.9847>
- Macías Hernandez, N. E., Wangenstein, O. S., & Arnedo, M. (2016). The role of morphological evolution and prey specialization in adaptive radiations: The spider genus *Dysdera* in the Canary Islands. Paper presented at the Arquipelago.
- Martin, F., Boto, T., Gomez-Diaz, C., & Alcorta, E. (2013). Elements of olfactory reception in adult drosophila melanogaster. *The Anatomical Record*, 296(9), 1477-1488. <https://doi.org/10.1002/ar.22747>
- Moyes, C.D., & Schulte, P.M. (2007). Principios de fisiología animal (Primera ed.). Pearson Addison Wesley.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nikonov, A. A., & Leal, W. S. (2002). Peripheral coding of sex pheromone and a behavioral antagonist in the japanese beetle, *Popillia japonica*. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 1075-1089. <https://doi.org/10.1023/A:1015274104626>
- Persons, M. H., & Rypstra, A. L. (2000). Preference for chemical cues associated with recent prey in the wolf spider *Hogna helluo* (Araneae: Lycosidae). *Ethology*, 106(1), 27-35. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00496.x>
- Persons, M. H., Walker, S. E., Rypstra, A. L., & Marshall, S. D. (2001). Wolf spider predator avoidance tactics and survival in the presence of diet-associated predator cues (Araneae: Lycosidae). *Animal Behaviour*, 61(1), 43-51. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1594>
- R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

- Řezáč, M., Pekár, S., & Lubin, Y. (2008). How oniscophagous spiders overcome woodlouse armour. *Journal of Zoology*, 275(1), 64-71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00408.x>
- Řezáč, M., Pekar, S., Arnedo, M., Macías-Hernández, N., & Řezáčová, V. (2021). Evolutionary insights into the eco-phenotypic diversification of *Dysdera* spiders in the Canary Islands. *Organisms Diversity & Evolution*, 21, 79-92. <https://doi.org/10.1007/s13127-020-00473-w>
- Riveron, J., Boto, T., & Alcorta, E. (2013). Transcriptional basis of the acclimation to high environmental temperature at the olfactory receptor organs of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-259>
- Rodríguez Diego, J. G., Arece, J., Olivares, J. L., & Roque, E. (2009). Origen y evolución de arthropoda. *Revista De Salud Animal*, 31(3), 137-142.
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, F. G., & Rozas, J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3), 208-216. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.55>
- Schulz, S., & Toft, S. (1993). Identification of a sex pheromone from a spider. *Science*, 260(5114), 1635-1637. <https://doi.org/10.1126/science.260.5114.1635>
- Steinbrecht, R. A. (1997). Pore structures in insect olfactory sensilla: A review of data and concepts. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26(3-4), 229-245. [https://doi.org/10.1016/S0020-7322\(97\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7322(97)00024-X)
- Toft, S., & Macías-Hernández, N. (2017). Metabolic adaptations for isopod specialization in three species of *Dysdera* spiders from the Canary Islands. *Physiological Entomology*, 42(2), 191-198. <https://doi.org/10.1111/phen.12192>
- Toft, S., & Macías Hernández, N. (2021). Prey acceptance and metabolic specialisations in some canarian dysdera spiders. *Journal of Insect Physiology*, 131, 104227. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104227> <https://doi.org/10.1111/phen.12192>
- Uhl, G. (2012). Spider olfaction: Attracting, detecting, luring and avoiding. *Spider ecophysiology* (pp. 141-157). Springer.
- Vickers, N. J., Christensen, T. A., Baker, T. C., & Hildebrand, J. G. (2001). Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature*, 410(6827), 466-470. <https://doi.org/10.1038/35068559>
- Vizueta, J., Frias-Lopez, C., Macias-Hernandez, N., Arnedo, M. A., Sanchez-Gracia, A., & Rozas, J. (2017). Evolution of chemosensory gene families in arthropods: Insight from the first inclusive comparative transcriptome analysis across spider appendages. *Genome Biology and Evolution*, 9(1), 178-196. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw296>
- Vizueta, J., Rozas, J., & Sánchez-Gracia, A. (2018). Comparative genomics reveals thousands of novel chemosensory genes and massive changes in chemoreceptor repertoires across chelicerates. *Genome Biology and Evolution*, 10(5), 1221-1236. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy081>
- Wilson, R. I. (2013). Early olfactory processing in *Drosophila*: Mechanisms and principles. *Annual Review of Neuroscience*, 36, 217-241. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150533>