

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA  
V PRAZE**

**Fakulta životního prostředí**

Katedra ekologie



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta životního  
prostředí**

**Morfologické a histologické adaptace  
reprodukčních a snovacích orgánů araneomorfních  
pavouků**

*Morphological and histological adaptations  
of the reproductive and silk organs of araneomorph  
spiders*

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Ing. Tomáš Krejčí**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Saska, Ph.D.  
Odborný konzultant: RNDr. Milan Řezáč, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Milana Řezáce, Ph.D. a doc. RNDr. Pavla Sasky, Ph.D., a že jsem uvedl všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpal. Současně dávám svolení k uveřejnění této práce na webových stránkách FŽP ČZU.

V Praze 25. 8. 2017

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří se podíleli na realizaci této práce. Především bych velmi rád poděkoval Milanovi Řezáčovi za pomoc ve všech aspektech vědecké práce, zejména za ochotu, trpělivost, množství poskytnutých poznatků a velké množství času, který mi věnoval po celou dobu studia. Bez jeho vedení by tato práce nikdy nevznikla. Dále bych rád poděkoval Pavlovi Saskovi za pomoc a vedení během celého doktorského studia a všem spoluautorům, zejména pak Peteru Michalíkovi za uvedení do problematiky ultrastruktury tkání pavouků, Jonasu Wolffovi za možnost spolupráce na výzkumu snovacích žláz u čeledi Gnaphosidae, Sáře Goodacre za možnost stáže v její laboratoři na University of Nottingham, celému kolektivu z Laboratoře elektronové mikroskopie v Českých Budějovicích a mnoha dalším lidem, kteří mi během celého studia pomáhali.

V neposlední řadě bych také rád poděkoval celé své rodině a přítelkyni za neutuchající psychickou a materiální podporu.

Výzkum byl finančně podpořen Interní grantovou agenturou FŽP ČZU (4211013123132, 4211013123136, 4211013123133, 4211013123183).

## Abstrakt

S výjimkou velkých ampulovitých žláz je výzkum všech ostatních typů pavoučích snovacích žláz značně opomíjen. Porozumění snovacímu aparátu pavouků však vyžaduje mnohem komplexnější znalosti nejen morfologie různých typů snovacích žláz, ale také vlastností produkovaných vláken a jejich využití v nejrůznějších situacích, především při lovu kořisti. Morfologický a histologický výzkum nezaostává pouze v otázce snovacích žláz. Jen málo studií se zabývalo ultrastrukturou a významem měkkých tkání v okolí kopulačních orgánů pavouků. Stepníci hrají díky svému fylogeneticky bazálnímu postavení mezi entelegynními pavouky zásadní roli a stavba jejich kopulačních orgánů může hrát důležitou roli ve snaze porozumět vývoji entelegynních pavouků.

V rámci předkládané disertační práce jsme se pokusili zodpovědět následující otázky: (1) Jaká je morfologická a histologická struktura kopulačních orgánů u stepníka rudého (*Eresus kollari*)? (2) Jak se liší morfologie malých a velkých ampulovitých žláz u kribelátních a nekribelátních pavouků a jaká je jejich funkce? (3) Jaká je morfologie piriformních snovacích žláz u čeledi Gnaphosidae a k čemu slouží a jaké vlastnosti má vlákno produkované těmito žlázami?

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie jsme zkoumali morfologickou stavbu samičích kopulačních orgánů a histologické charakteristiky okolních tkání stepníka rudého (*Eresus kollari*). Nalezli jsme dva typy pórů asociovaných s různými částmi kopulačních orgánů: (1) na anteriorních výdutích se vyskytující malé množství velkých pórů a (2) na spermatékách se vyskytující velké množství velmi malých pórů. Kolem těchto pórů jsme našli dva typy epitelu. Anteriorní výdutě jsou obklopeny epitelem, který je složen z glandulárních jednotek Třídy 3, zatímco spermatéky jsou obklopeny transportním epitelem, který je charakteristický nápadným basálním labyrintem a apikálním komplexem nesoucím velké množství mikrovily.

Vlákna malých ampulovitých žláz jsou u kribelátních pavouků využívány k formování adhezivního komplexu, který slouží k lovu kořisti. Malé ampulovité žlázy se ovšem zachovaly i u nekribelátních skupin pavouků, kde se adaptovaly k jiné činnosti. V této práci srovnáváme morfologii velkých a malých ampulovitých žláz u příbuzných kribelátních a nekribelátních čeledí v rámci nadčeledi

Amaurobioidea. Zjistili jsme, že u kribelátních zástupců jsou malé ampulovité žlázy velmi často vidlicovitě větvené. Toto větvení může hrát důležitou roli při formování kribelátního adhezivního svazku.

U čeledi Gnaphosidae jsme se zaměřili na výzkum piriformních snovacích žláz. U této čeledi jsou piriformní žlázy včetně jejich spigotů oproti běžné situaci výrazně zvětšené. Důvodem této morfologické adaptace je důležitá role těchto žláz při lovu kořisti. Vlákno produkované těmito žlázami má silné adhezivní vlastnosti a zároveň je dostatečně pevné s vysokou elasticitou a houževnatostí. Vlákno s těmito vlastnostmi je tak ideální pro lov a imobilizaci kořisti.

**Klíčová slova:** spermatéka, kopulační kanálek, kribelátní vlášení, malá ampulovitá snovací žláza, piriformní vlákno, snovací bradavka

## **Abstract**

With the exception of major ampullate glands, the research of all other types of spider silk glands is considerably overlooked. The understanding of the spider silk apparatus requires much more complex knowledge not only of the morphology of different types of silk glands, but also of the properties of the fibers produced and their use in various situations, especially in prey capturing. Morphological and histological research lags behind not only in the silk glands. Only a few studies have dealt with the ultrastructure and with the importance of the soft tissues around the spider female genital system. Velvet spiders play a crucial role due to the most basal position in phylogeny of entelegynous spiders, and the construction of their genital system can play an important role in an understanding of the evolution of entelegynous spiders.

In this thesis I tried to answer the following questions: (1) What is the morphological and histological structure of the copulatory organs of the velvet spider *Eresus kollari*? (2) How does the morphology of minor and major ampullate glands differ in the cribellate and ecribellate spiders and what is their possible utilization? (3) What is the morphology of the piriform glands in the family Gnaphosidae, what are the glands used for and what properties does the fiber produced by these glands have?

Using light and electron microscopy, we investigated the morphological structure of the female genital organs and the histological characteristics of the surrounding epithelium of the velvet spider *Eresus kollari*. We found two types of pores associated with different parts of the copulatory organs: (1) a small amount of large pores occurring on anterior bulges, and (2) a large number of very small pores occurring on spermathecae. Around these pores we found two types of epithelium. Anterior bulges are surrounded by an epithelium composed of class 3 gland cells, while spermathecae are surrounded by a putative transport epithelium characterized by an extensive basal labyrinth and an apical complex carrying a large amount of microvilli.

Silks of the minor ampullate glands in cribellate spiders are used to form an adhesive complex for capturing prey. Minor ampullate glands, however, have not been lost in ecribellate groups of spiders and adapted to other activities. In this work, we compare the morphology of major and minor ampullate glands in related cribellate and

cribellate groups within spider families of the traditional Amaurobioidea. We have found that minor ampullate glands are very often bifurcated in the cribellate members of this group and this bifurcation can play an important role in cribellate capturing band formation.

We also focused on the piriform glands in the family Gnaphosidae. In these spiders, the piriform glands, including their spigots, are significantly enlarged. The reason for this morphological adaptation is the important role of these glands for capturing prey. The fibers produced by these glands have strong adhesive properties and also are strong enough with high elasticity and toughness. The fiber with these properties is so ideal tool for capturing and immobilizing prey.

**Keywords:** Spermatheca, copulatory duct, cribellate capturing band, minor ampullate silk gland, piriform silk, spinneret

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	3
3. Literární rešerše .....	4
3.1. Skladování spermatu u pavouků .....	4
3.2. Morfologie samičích pohlavních orgánů u stepníků rodu <i>Eresus</i> .....	6
3.3. Kopulační zátky .....	6
3.4. Uspořádání spermií .....	7
3.5. Morfologie snovací žlázy.....	8
3.6. Struktura vlákna.....	10
3.7. Typy snovacích žláz.....	11
4. Seznam použité literatury I.....	20
5. Výsledky disertační práce .....	33
A    Female genital morphology and sperm storage in the velvet spider <i>Eresus kollari</i> (Araneae: Eresidae).....	34
A.1. Introduction .....	35
A.2. Methods .....	36
A.3. Results .....	37
A.4. Discussion .....	38
A.5. Literature cited .....	40
A.6. Figures .....	44
B    Morphological and functional diversity of minor ampullate glands and silk in spiders from the superfamily Amaurobioidea (Entelegynae: RTA clade).....	48
B.1. Introduction .....	49
B.2. Methods .....	52
B.3. Results .....	52



B.4.	Discussion.....	54
B.5.	Literature cited.....	59
B.6.	Tables.....	63
B.7.	Figures .....	65
C	Hunting with sticky tape: Functional shift in silk glands of araneophagous ground spiders (Gnaphosidae) .....	73
C.1.	Introduction .....	74
C.2.	Methods .....	75
C.3.	Results .....	79
C.4.	Discussion.....	83
C.5.	Conclusion .....	88
C.6.	Literature cited.....	89
C.7.	Tables.....	94
C.8.	Figures .....	95
6.	Závěr.....	101
7.	Seznam použité literatury II .....	106

## 1. Úvod

Na světě se vyskytuje cca 47 000 druhů pavouků řazených přibližně do 100 čeledí (World Spider Catalog 2017). Tato diverzita s sebou nese i mnoho černých míst na poli vědecké práce, tím spíše na poli popisné morfologie a histologie. Tyto základní znalosti jsou však velmi důležité pro pochopení dalších procesů, které se od nich odvíjejí.

Studie, zabývající se morfologií snovacích žláz, se zaměřují především na velké ampulovité žlázy a jejich vlákna. Tyto žlázy, které jsou největší ve srovnání napříč všemi dalšími typy, se otevírají na předních postranních snovacích bradavkách a produkují dlouhá silná vlákna, která patří k nejpevnějším mezi pavouky. Pavouci je využívají jako vlečná jistící vlákna, pro konstrukci rámu u sítí křížáků nebo jako balón sloužící k šíření větrem (Foelix 2011). Další velké žlázy otevírající se na zadních středních snovacích bradavkách se nazývají malé ampulovité a jejich morfologie do značné míry odráží morfologii velkých ampulovitých žláz, jsou ovšem menší.

U některých kribelátních pavouků malé ampulovité žlázy produkují vlákna, která jsou společně s kribelátními, parakribelátními a pseudoflageliforními vlákny součástí adhezivního svazku vláken sloužícího k lovu kořisti. Na rozdíl od kribelátních a parakribelátních snovacích žláz, které vždy chybí u nekribelátních pavouků, malé ampulovité žlázy zůstaly ve většině případů zachovány, dokonce i u druhů, které již po delší dobu nemají schopnost produkovat kribelátní adhezivní vlášení. Místo toho začal produkt malých ampulovitých žláz plnit jiné funkce (Tillinghast et al. 1981; Work 1981; Peters 1990; Peters & Kooor 1991; La Mattina et al. 2008). V této disertační práci jsme se zaměřili na srovnání morfologie velkých a malých ampulovitých žláz u blízce příbuzných kribelátních a nekribelátních zástupců nadčeledi Amaurobioidea s cílem upřesnit roli malých ampulovitých žláz u kribelátních pavouků při formování adhezivního kribelátního svazku (Řezáč et al. 2017).

Nebezpečí hrozící ze strany kořisti značně ovlivňuje volbu predátora, zda se pokusit danou kořist ulovit (Mukherjee & Heithaus 2013). Navzdory vysokým rizikům se však mnoho pavouků na lov nebezpečné kořisti specializuje (Pekár & Toft 2015). Zástupci čeledi Gnaphosidae patří k aktivně lovicím pavoukům, kteří se pohybují po

povrchu země a netkají lapací sítě. U mnoha druhů této čeledi byl zaznamenán lov nebezpečné kořisti, jako jsou mravenci či jiní pavouci (Bristowe 1958; Grimm 1985; Jarman & Jackson 1986; Jäger 2002; Pekár et al. 2012). Velké ampulovité žlázy jsou obvykle jediné velké snovací žlázy otevírající se na předních postranních snovacích bradavkách araneomorfních pavouků. U čeledi Gnaphosidae však došlo v důsledku adaptace na lov nebezpečné kořisti k enormnímu zvětšení piriformních žláz (Kovoor 1987; Platnick 1990; Murphy 2007). Naším cílem bylo detailně popsat techniku lovu, zjistit, jak morfologické změny ve snovacím aparátu na předních postranních snovacích bradavkách ovlivnily jednu ze základních funkcí piriformních žláz – tvorbu přichytných disků, a dále popsat fyzikální vlastnosti piriformních vláken (Wolff et al. 2017).

Jen několik málo studií se soustředilo na výzkum ultrastruktury a možnou funkci epitelů složených z glandulárních jednotek 3. třídy, které obklopují samičí pohlavní orgány u pavouků (Cook 1966; Uhl 1994a; Uhl 2000; Michalik et al. 2005). Tento glandulární epitel je obvykle soustředěn v místech, kde dochází ke skladování spermatu, avšak funkce sekretu produkovaného těmito buňkami není známá. Předpokládá se, že hraje roli ve výživě a aktivaci spermií (Herberstein et al. 2011; Vöcking et al. 2013). Fylogeneticky nejbazálnější postavení v rámci entelegynních pavouků má čeleď Eresidae (Miller et al. 2012) a znalosti o stavbě jejich kopulačních orgánů mohou hrát důležitou roli v porozumění vývoje entelegynních genitálií. V rámci naší studie jsme se pokusili odpovědět na otázky zabývající se uskladněním spermií a ultrastrukturou epitelů obklopujících samičí kopulační orgány (Krejčí et al. 2015).

## 2. Cíle práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo pomocí transmisní a skenovací elektronové mikroskopie popsat histologické a morfologické charakteristiky kopulačních orgánů stepníka rudého (*Eresus kollari* (Rossi, 1846)), dále pak popsat morfologii malých a velkých ampulovitých snovacích žláz u vybraných kribelátních a nekribelátních zástupců nadčeledi Amaurobioidea a objasnit funkci piriformních žláz v lovecké strategii pavouků čeledi Gnaphosidae.

Disertační práce si klade za cíl zodpovědět následující otázky:

- A. Jaká je morfologická struktura kopulačních orgánů u stepníka rudého (*Eresus kollari*)? Jaká je funkce glandulárních pórů vyskytujících se na kopulačních kanálcích a spermatékách? Jaké žlázy jsou s těmito póry asociovány? Kde je uskladněno sperma?
- B. Jaká je morfologie malých a velkých ampulovitých snovacích žláz v rámci nadčeledi Amaurobioidea? Jak se liší morfologie malých a velkých ampulovitých žláz u kribelátních a nekribelátních pavouků? Jaká je funkce rozvětvení malých ampulovitých žláz u kribelátních pavouků?
- C. Jaká vlákna využívají při lovu kořisti pavouci čeledi Gnaphosidae? Jaká je morfologie snovacích žláz ústících na předních postranních snovacích bradavkách? Jaké jsou vlastnosti snovacích vláken produkovaných piriformními snovacími žlázami?

### 3. Literární rešerše

#### 3.1. Skladování spermatu u pavouků

U řady druhů musí sperma přežít po dlouhou dobu uvnitř reprodukčního traktu samice, aby mohlo následně dojít k fertilizaci. U druhů, kde je inseminace a fertilizace časově oddělená, přírodní selekce favorizovala mechanismy k zajištění přežití spermií uvnitř samice. Proto u většiny druhů bezobratlých nalezneme vysoce specializované orgány pro skladování spermatu. Tyto orgány jsou označovány jako spermatéky (Pitnick et al. 1999) a nalezneme je taktéž téměř u všech druhů pavouků.

Na základě několika somatických charakteristik a morfologie samičích pohlavních orgánů jsou pavouci děleni do dvou skupin, Haplogynae a Entelegynae (Simon 1892–1903). U těchto dvou skupin pavouků existují dva strukturálně odlišné typy samičích kopulačních orgánů. Samice ze skupiny haplogynních pavouků mají primitivnější reprodukční systém sestávající z ektodermální pohlavní dutiny a prostorově oddělených spermaték (receptacula seminis), kdy spermatéka je propojena s pohlavní dutinou jedním kanálkem, který slouží jak jako inseminační, tak jako fertilizační. Z takového uspořádání poté těží samec, který se se samicí spáří jako poslední, jelikož jeho sperma je uloženo nejbližší vývodu k vajíčkům (Austad 1984). Odvozený kopulační systém samic entelegynních pavouků sestává taktéž z pohlavní dutiny a spermaték. Avšak na rozdíl od samic haplogynních druhů dochází k inseminaci a fertilizaci skrze samostatné kanálky. Kopulační kanálek spojuje sklerotizovanou pohlavní destičku (epigynu) se spermatékou, fertilizační spojuje spermatéku s uterus externus, kde dochází k oplodnění vajíček (Uhl 2000). Toto uspořádání je naopak výhodné pro samce, který se se samicí páří jako první, jelikož jeho sperma je při fertilizaci vajíček první na řadě (Austad 1984).

Spermatéky jsou obvykle obklopeny sekrečním epitelem složeným z různých typů sekrečních buněk. Noirot & Quenedey (1974, 1991) popsali tři typy glandulárních buněk. První typ glandulární buňky (Třída 1) je přímo napojen na kutikulu a sekret musí překročit tuto bariéru. Druhý typ buněk (Třída 2) je inkorporován do epidermis, nepřichází však do přímého kontaktu s kutikulou. Sekret musí projít buď skrze přilehlé epidermální buňky, nebo skrze hemolymfu. Třetí typ (Třída 3) je tvořen několika buňkami propojených s kutikulou skrze kutikulární kanálek, kterým proudí sekret přes kutikulu.

Informací o sekrečním epitelu asociovaném se samičím pohlavním ústrojím je velmi málo. Třesavka *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) jako jedna z mála druhů pavouků neskladuje sperma ve spermatékách, ale přímo v pohlavní dutině (Uhl 1994a). Na dorzální stěně pohlavní dutiny se nalézají sklerotizovaná pórovitá struktura, na kterou se napojují sekreční žlázy třídy 3. Každá glandulární jednotka sestává ze dvou propojených sekrečních buněk, které jsou obklopeny dalšími dvěma buňkami tvořícími jednak schránku celé sekreční jednotky a jednak kanálek, kterým je odváděn sekret skrze póry do uteru (Uhl 1994b).

U dvou druhů haplogynních pavouků, šestioček *Dysdera crocata* C. L. Koch, 1838 a *Dysdera erythrina* (Walckenaer, 1802), byl demonstrován výskyt dvou struktur sloužících k uskladnění spermatu: anteriorní spermatéka tvořená dvěma laloky a posteriorní divertikulum, velká dilatace pohlavní dutiny (Cook 1966; Uhl 2000). Divertikulum je lemováno zvlněnou kutikulární vrstvou s velkými glandulárními póry. Tyto póry jsou asociovány pouze s jednou glandulární buňkou (Třída 1), která vylučuje sekret skrze kutikulární tuberkula do prostoru divertikula. U spermatéky, která má taktéž pórovitou strukturu, ale póry jsou mnohem menší, je tato jednotka tvořena několika glandulárními buňkami (Třída 3), které vylučují sekret do jednoho společného kanálku, tvořeného třemi páry kanálkových buněk. Jednotlivé funkční jednotky jsou od sebe odděleny interkalárními buňkami. Dva typy velmi odlišných žláz asociovaných s různými uskladňovacími prostory pro spermie budou pravděpodobně produkovat odlišné sekrety, které budou vytvářet odlišné podmínky pro skladování spermií. Spermie ve spermatéce jsou na rozdíl od spermií v divertikulu pevně natěsnané u sebe a obklopeny menším množstvím sekretu. Posteriorní divertikulum je pravděpodobně využíváno pro krátkodobé uskladnění spermií, zatímco spermatéka pro dlouhodobé (Uhl 2000).

Sekreční epitel u druhu *Segestria senoculata* (Linné, 1758), která má podobné uspořádání pohlavních orgánů jako rod *Dysdera*, je složen taktéž z jednotek třídy 3 (tři sekreční buňky a jedna kanálková buňka). Na rozdíl od rodu *Dysdera* je tento typ asociován jak s divertikulem, tak se spermatékami (Suhm 1992, nepublikovaná diplomová práce, University of Heidelberg, Německo in Uhl 2000).

Michalik et al. (2005) našel na spermatékách u sklípničky *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) taktéž glandulární buňky třídy 3 a stejně jako Uhl (2000) se přiklání

k hypotéze, že sekret těchto buněk se pravděpodobně podílí na dlouhodobém skladování spermií.

I mezi entelegynnými pavouky nalezneme zástupce s diferenciovanými prostory pro uložení spermatu. Příkladem může být plachetnatka *Pityohyphantes phrygianus* (C. L. Koch, 1836), u které se nacházejí dva druhy spermaték. Jedna spermatéka je rovná a tvarem připomíná palec, druhá obtáčí zhruba v polovině první. Stejně jako u *D. erythrina* se i zde liší žlázy asociované se spermatékami. První spermatéka je vybavena jednoduchými glandulárními buňkami, zatímco druhá, stočená, je obklopena velkými glandulárními buňkami různého typu, které vylučují svůj sekret skrze dlouhé sekreční kanálky. Právě tato spermatéka by mohla sloužit pro dlouhodobé skladování spermatu (Uhl & Gunnarsson 2001).

Zajímavým případem je i *Amaurobius fenestralis* (Ström, 1768), u kterého se na jednom typu spermatéky vyskytují dva různé typy pórů. Velké množství malých pórů a po jednom velkém póru na každé spermatéce. I zde jsou tyto póry asociovány s různým typem sekrečních buněk (Suhm & Alberti 1993).

### **3.2. Morfologie samičích pohlavních orgánů u stepníků rodu *Eresus***

Stepníci jsou fylogeneticky nejbazálnější skupinou entelegynných pavouků (Miller et al. 2012). Uspořádání samičích kopulačních orgánů je stejné jako u ostatních entelegynných pavouků, tzn. s odděleným kopulačním a fertilizačním kanálkem (Uhl 2002). Epigyna stepníka rudého (*Eresus kollari*) je charakteristická nepřítomností zřetelných kopulačních otvorů. Místo nich zde nalézáme podélné záhyby, které pronikají hluboko a jsou propojeny s vnitřní částí kopulačních orgánů (Krejčí et al. 2015). Dále následuje kanálek, jehož stavbu prezentují různí autoři odlišně. Miller et al. (2012) prezentuje tuto část jako anteriorní součást spermatéky, zatímco Řezáč et al. (2008) jako kopulační kanálek, který je tvořen sklerotizovaným eliptickým orgánem v přední části vulvy. Na tento kanálek dále navazují spermatéky, které jsou tvořeny výraznými laloky. Spermatéky vyúsťují fertilizačním kanálkem do dělohy (Řezáč et al. 2008).

### **3.3. Kopulační zátky**

Kompetice spermií je velmi silným selekčním tlakem pro vznik mnoha fyziologických, behaviorálních a morfologických adaptací (Parker 1970). Jednou

z mnoha takovýchto adaptací jsou i kopulační zátky. Vyskytují se zejména u entelegynních pavouků, kde díky oddělenému kopulačnímu a fertilizačnímu kanálku nedojde zneprístupněním kopulačního kanálku zároveň k nemožnosti oplodnit vajíčka spermii uloženými ve spermatéce samice (Uhl et al. 2010). U haplogynních pavouků, kde je spermatéka s jediným kanálkem, jsou kopulační zátky vzácností (Huber 2005; Uhl et al. 2010). U pavouků jsou kopulační zátky tvořeny různými amorfními materiály (Strand 1906; Roberts 1993; Raven & Stumkat 2005; Marusik & Crawford 2006), zalamováním samčích sekundárních kopulačních orgánů (Knoflach 2002, Kuntner et al. 2008, Uhl et al. 2007) či celým tělem samce, které funguje jako kopulační bariéra (Foellmer & Fairbairn 2003; Knoflach & Benjamin 2003).

Kopulační zátky z amorfních materiálů obvykle tvoří samci. Žlázy sloužící k tvorbě amorfního sekretu mohou být umístěny v samčím pohlavním traktu (Knoflach 1998, 2004), v oblasti úst (Braun 1956) či v samčím bulbu vedle reservoáru pro spermie (Suhm et al. 1996).

Materiál pro tvorbu kopulačních zátek však může být kombinací samčích i samičích produktů. U čelistnatky *Leucauge mariana* (Taczanowski, 1881) samice dokáže ovlivnit kvalitu sekretu přidáním či nepřidáním vlastní složky (Eberhard 2004; Aisenberg & Eberhard 2009). Spolupráce na tvorbě amorfní zátky byla pozorována také u několika snovaček rodu *Theridion* (Knoflach 1998, 2004). Možnosti samice ovlivnit kvalitu kopulační zátky může sloužit jako „cryptic female choice“, kdy samice může ovlivnit osud ejakulátu buď preferovaného či nechtěného samce (Uhl et al. 2010).

### 3.4. Uspořádání spermií

Pohlavní buňky se u pavouků vyvíjejí v párovitých strukturách uvnitř zadečku. Vajíčka jsou tvořena v hroznovitých vaječnicích samic. Spermie samců se vyvíjejí v trubicovitých varlatech. Samici jsou spermie předávány zabalené a nepohyblivé. Obal chrání spermie během skladování v samičích spermatékách a během transportu samčím sekundárním pohlavním orgánem (Foelix 2011). Spermie jsou aktivovány až teprve těsně před fertilizací vajíček (Brown 1985).



Uspořádání spermií v obalu je různé a u pavouků rozlišujeme tři druhy: (1) cleistospermie, kde každá spermie má vlastní obal (Alberti & Weinmann 1985), (2) coenospermie, kde je až 100 spermií uzavřeno ve společném obalu (Bertkau 1877), a (3) synspermie, kde několik spermatid splývá do jednoho syncytia (Alberti 1990). Mesothelae a Theraphosidae mají coenospermie, které jsou proto považovány za nejprimitivnější typ (Alberti et al. 1986; Michalik et al. 2004, Michalik 2007, Michalik & Ramirez 2014). U většiny araneomorfních pavouků se vyskytují cleistospermie (Michalik & Ramirez 2014), synspermie se pak vyskytují téměř u všech nekribelátních Haplogynae (Michalik & Ramirez 2014).

### 3.5. Morfologie snovací žlázy

Snovací žláza se skládá ze sekreční části, na kterou navazuje snovací kanálek vyústující spigotem na snovacích bradavkách. Sekreční část je obvykle prodloužená a trubicovitá (označovaná jako tail). U pavouků, kteří staví velké sítě či potřebují produkovat velké množství vláknů v krátkém čase, je přítomna také tzv. ampula. Je to rozšířená proximální část sekreční zóny, která se nachází před snovacím kanálkem a slouží k uskladnění většího množství materiálu pro tvorbu vlákna (Kovoor 1987). Rychlejší potřebě produkce velkého množství vlákna odpovídá také délka tailu. Vzácným případem je výskyt dvou ramen (Apstein 1889; Anatasiu-Dumitresco 1941; Řezáč et al. 2017) či mnohačetného větvení (Apstein 1889; Kiesow-Starck 1932; Kovoor 1976, 1987; Řezáč et al. 2017). Množstvím sekrečních buněk a objemem produkovaného materiálu tail několikanásobně převyšuje ampulu. Velikost vnitřního povrchu tailu je tak co se množství produkce týče mnohem důležitější, než velikost ampuly, která tak slouží spíše jako skladovací prostor (Peakall 1969; Pouchkina et al. 2003). Hranice mezi ampulou a tailem je tvořena prostým zúžením, tail i přilehlá část ampuly jsou tvořeny stejným typem buněk (Řezáč et al. in prep.).

Sekreční část je obvykle složena ze dvou sekrečních zón (u některých ampulovitých žláz až ze tří), které se liší průhledností či barvou a jsou od sebe jasně odděleny (Řezáč et al. in prep.). Tyto zóny se liší typem sekrečních buněk a produkují různé části vlákna. Distální část produkuje jádro vlákna, zatímco proximální část produkuje obal vlákna (Kovoor 1987). První zóna (označovaná jako A) je složena z tailu a počáteční části ampuly. Další jedna či dvě zóny formují zbývající část ampuly (Řezáč et al. in prep.). Zřídka se vyskytující střední zóna (označovaná jako A2) se

vyskytuje u žláz produkujících dlouhá a tuhá vlákna (Palmer 1985). Tato zóna produkuje amfifilický protein, který spojuje hydrofobní jádro a hydrofilní obal (Palmer 1985). Zóna přiléhající k duktu (označovaná jako B) obvykle produkuje pevný glykoproteinový obal vlákna. Chrání vlákno před vznikem trhlin, před vodou nebo může sloužit jako lubrikant usnadňující průchod vlákna skrze spigot (Palmer 1985).

Materiál produkovaný v sekreční části je dále zpracováván v kanálku, který je s ampulou velmi často propojen skrze kutikulární trychtýř (Vollrath & Knight 1999). Tato struktura zpevňuje počátek duktu, kde je tlak produkovaného materiálu velmi vysoký, zejména když je potřeba rychle velké množství vlákna, a brání tak poškození žlázy (Řezáč et al. in prep.).

Šířka duktu se směrem ke spigotu postupně zmenšuje (Knight & Vollrath 1999; Casem et al. 2002). V duktu dochází k postupné přeměně tekutého krystalu v pevné vlákno. Dochází k prodlužování a řazení proteinových molekul (Work 1977), reabsorbci vody (Kovoor & Zylberberg 1972) a výměně  $K^+$  a  $Na^+$  iontů (Tillinghast et al. 1984). Čím delší dukt, tím lépe probíhá řazení molekul a vlákno je delší a pevnější (Kovoor 1987). Důležitou roli hraje také šířka duktu. Užší dukt umožňuje lepší řazení a krystalizaci molekul, vlákna jsou pevnější, ale méně elastická než u širšího duktu (Swanson et al. 2007). Dukt je často (zejména u ampulovitých a flageliforních žláz) stočen do kličky připomínající písmeno S, která je uzavřena v bazální membráně (Vollrath et al. 1996). Díky tomuto uspořádání dochází k lepší reabsorbci vody a solí (Vollrath et al. 1998; Vollrath & Knight 2001).

Na bázi snovací bradavky u velkých a malých ampulovitých žláz se u některých araneomorfních pavouků nachází region se zesílenou kutikulou (Wilson 1969). Tato oblast bývá nazývána valva. Tato struktura umožňuje pavoukovi kontrolovat pohyb při spouštění se na ampulovitém vlákně (Vollrath et al. 1998) nebo umožňuje restartování produkce vlákna v případě, že se přetrhne v kanálku (Vollrath & Knight 1999).

Dukt končí v duté struktuře, která je označována jako spigot, jehož hlavním úkolem je správné umístění vlákna. Spigot je obvykle složen ze tří částí: široké a krátké základny, prodlouženého rezervoáru a štíhlého koncového oddílu, který uzavírá spigot (Kovoor & Peters 1988; Vollrath et al. 1998). Koncová část má podobu

flexibilních pysků a těsně objímá produkované vlákno. Spigoty žláz, které produkují tekutý sekret, jsou široké a při uzavření dojde k jejich zploštění (Řezáč et al. in prep.).

### 3.6. Struktura vlákna

Všechna pavoučí vlákna jsou složena z jednoho či více proteinů, které se u pavouků nazývají spidroiny. Velká centrální část je tvořena množstvím repetitivních aminokyselinových sekvencí. Centrální část je z jedné strany ohraničena N-zakončením a z druhé C-zakončením (Ayoub et al. 2007; Garb et al. 2010). Spidroiny jsou syntetizované v tailu snovací žlázy a jsou uchovávány v lumenu žlázy. Tyto zprvu náhodně orientované proteiny se postupně řadí a vytvářejí jednotky, které spolu díky vysoké koncentraci roztoku interagují za pomoci nekovalentních sil. Dochází k paralelní orientaci těchto jednotek a vzniku tzv. tekutého krystalu, který se chová jako tekutina, ale zároveň si zachovává některé vlastnosti krystalu (Viney et al. 1994; Viney 1997; Knight & Vollrath 1999; Vollrath & Knight 2001).

Vlákna produkovaná pavouky jsou velmi tenká. Drobný průměr šetří materiál a zároveň jsou tato vlákna pro kořist špatně viditelná (Vollrath & Knight 2001). Vlákno je obvykle na průřezu lehce eliptické (Thiel et al. 1994) a má dvě hlavní složky – jádro a obal. Obal se skládá z několika tenkých vrstev produkovaných příslušnými sekrečními zónami. Vrstva ležící nejbliže povrchu vlákna je produkována zónou ležící nejbliže k duktu a naopak (Vollrath & Knight 1999).

Nejsvrchnější vrstva je tvořena lipidy (Schultz & Toft 1993a; Frische et al. 1997) a bývá nosičem feromonů (Schultz & Toft 1993b).

Pod lipidovou vrstvou je tenká vrstva tvořená hydrofobními glykoproteiny (Casem et al. 2002). Tato vrstva může sloužit jako lubrikant během snování vlákna skrze dukt a zabránit tak povrchovému poškození vlákna či může regulovat vodní režim (Sponner et al. 2007). U piriformních žláz také zajišťuje adhezi vlákna (Řezáč et al. in prep.).

U velkých ampulovitých žláz křížáků je přítomna ještě další proteinová vrstva pod glykoproteinovou vrstvou, která je produkována pravděpodobně A2 zónou (Dicko et al. 2004). Proteiny, které tvoří tuto vrstvu, mají tendenci se agregovat ještě mnohem

více než ty v jádře vlákna. Díky tomu je obal vlákna mnohem pevnější než jeho jádro (Vollrath 2000) a obsahuje vyšší koncentraci  $\beta$ -listů (Knight et al. 2000; Sponner et al. 2007). Tato vrstva je dále také hydrofobnější než jádro (Vollrath 2000).

Jádro vlákna se skládá ze dvou vrstev. Vnější vrstva je pevnější, jelikož obsahuje větší množství  $\beta$ -listů (Sponner et al. 2007). Vnitřní vrstva je složená ze silně nahloučených spidroinových nanofibril. Toto uspořádání, kdy je v jádře větší množství fibril, zajišťuje vláknu lepší vlastnosti, než kdyby zde bylo pouze jedno silné vlákno, brání tak mnohem účinněji přetržení vlákna (Vollrath et al. 1996; Vollrath 2000; Sponner et al. 2007). Každá nanofibrila obsahuje těsně uspořádané krystaly tvořené  $\beta$ -listy propojené amorfni matrix (Thiel et al. 1994).

### 3.7. Typy snovacích žláz

Diverzita pavoučích snovacích žláz je velká (Kovoor & Peters 1988). Žlázy produkují vlákna s různými fyzikálními vlastnostmi, která jsou využívána k nejrůznějším funkcím. Jednotlivé žlázy vyúsťují na snovacích bradavkách (přední postranní (PPB), zadní střední (ZSB) a zadní postranní (ZPB)). Namísto předních středních bradavek se u kribelátních pavouků vyvinulo snovací políčko, nazývané kribelum. Níže následuje jednoduchá definice jednotlivých typů žláz (převzato z Řezáč et al. in prep.):

Žlázy otevírající se na kribelu	<i>kribelátní žlázy</i>
Žlázy otevírající se na PPB	
Malé početné	<i>piriformní žlázy</i>
Velké jednotlivé	<i>velké ampulovité žlázy</i>
Žlázy otevírající se na ZSB a ZPB	
Malé početné, nečlánkovaný spigot, dvě sekreční zóny	<i>aciniformní žlázy</i>
Malé početné, článkovaný nebo zploštělý spigot, jedna sekreční zóna, pouze u některých kribelátních pavouků	<i>parakribelátní žlázy</i>
Velké jednotlivé, pouze u dospělých samic	<i>tubuliformní žlázy</i>
Velké jednotlivé	
Žlázy otevírající se na ZSB	<i>malé ampulovité žlázy</i>
Žlázy otevírající se na ZPB	
U kribelátních pavouků	<i>pseudoflageliformní žlázy</i>

## U Araneoidea

Jeden pár, spigot není zploštělý, sekreční region není laločnatý	<i>flageliformní žlázy</i>
Dva páry, spigot je zploštělý, sekreční region je laločnatý	<i>agregátní žlázy</i>

**Velké ampulovité žlázy**

Velké ampulovité žlázy jsou obvykle jediné velké žlázy na předních postranních snovacích bradavkách u araneomorfních pavouků (Řezáč et al. 2017). Pouze u čeledi Pholcidae dosahují podobné velikosti piriformní snovací žlázy otevírající se taktéž na předních postranních bradavkách (Kovoor 1987; Huber 2000). U zástupců podčeledi Gnaphosinae (*Gnaphosa* a *Zelotes*) dochází naopak k redukci velkých ampulovitých žláz a ke zvětšení žláz piriformních (Wolff et al. 2017).

Název těchto žláz je odvozen od zvětšené skladovací části nazývané ampula (Kovoor 1977). Tento tvar sekreční části je u těchto žláz ovšem spíše vzácný (např. Araneoidea, Lycosoidea, Agelenidae nebo Dionycha). U většiny čeledí (např. Hypochilidae, Dysderidae, Lycosidae, Sicariidae) mají velké ampulovité žlázy trubicovitý tvar, bez výrazného přechodu mezi ampulou a tailem (Kovoor 1977). Kanálek je obvykle napojen na ampulu skrze silně sklerotizovanou nálevku (tzv. funnel). Velmi nápadná je např. u Araneoidea či Oxyopidae, naopak chybí např. u Dysderidae či Sicariidae (Knight & Vollrath 2002; Řezáč et al. in prep.).

Délka kanálku se u jednotlivých druhů velmi liší. Velmi dlouhý je u čeledí produkujících dlouhá a pevná vlákna (Araneidae, Thomisidae, Oxyopidae) (Řezáč et al. in prep.). U mnoha haplogynních čeledí je dukt rovný (Dysderidae, Diguettidae, Scytodidae, Telemidae) nebo může být esovitě prohnutý (Hypochilidae, Filistatidae, Sicariidae) (Knight & Vollrath 2002; Řezáč et al. in prep.). U některých haplogynních pavouků (Pholcidae, Gradungulidae, Segestriidae) a entelegynních je dukt stočen do podoby kličky, která je uložena v samostatné bazální membráně (Řezáč et al. 2017). Klička může být relativně krátká (Titanocidae, Amaurobiidae, Agelenidae, Eresidae, Lycosidae), ale také velmi dlouhá (Araneidae) (Řezáč et al. in prep.; Řezáč et al. 2017).

Tyto žlázy produkují dlouhá, velice pevná, ale zároveň poměrně pružná vlákna, kterými se pavouk jistí při lezení po vegetaci, využívá je při stavbě rámu a radiálních vláken sítě, pro šíření větrem (tzv. ballooning) (Kovoor 1987) či pro vnitrodruhovou komunikaci (Richter 1972). Samci některých druhů čeledi Pisauridae, Thomisidae (*Xysticus*), Tetragnathidae (*Meta*) a Nephilidae (*Nephila*) se brání kanibalistické predaci ze strany samice tím, že samici za použití tohoto vlákna před kopulací imobilizují (Bristowe 1941; Robinson & Robinson 1973; Bruce & Carico 1988; Merret 1988). Vlákno z velkých ampulovitých žláz je také součástí stabilimenta u křížáků (Peters & Kovoor 1980).

### **Malé ampulovité žlázy**

Tyto žlázy jsou podobné velkým ampulovitým žlázám (Moon 1998). Tato podobnost není pouze morfologická, ale u některých čeledí (např. Agelenidae a Eresidae, Kovoor 1977) produkují stejné/podobné produkty plnící stejné/podobné funkce. Tyto žlázy jsou však menší než velké ampulovité (Kovoor 1977), s jedinou výjimkou u rodu *Pholcus*, kde malé ampulovité žlázy samic jsou větší než velké ampulovité (Hopfmann 1934).

Malé ampulovité žlázy chybí u mnoha haplogynních skupin pavouků, vzácněji také u některých entelegynních (Řezáč et al. 2017).

Tyto žlázy produkují také dlouhá a pevná vlákna jako velké ampulovité žlázy, která však nejsou zdaleka tak pružná jako u velkých ampulovitých žláz a pavouk je využívá v případech, kdy by elasticita byla na obtíž (Stauffer et al. 1994; Hayashi et al. 1999). Na rozdíl od velkých ampulovitých žláz spigot malých ampulovitých žláz není asociován se spigoty piriformních žláz. Je tak mnohem těžší tato vlákna připevnit k podkladu či jednotlivá vlákna k sobě. U většiny kribelátních pavouků malé ampulovité žlázy produkují silnější spirálovitá vlákna tvořící podporu pro kribelátní vlákna, adhezivní materiál v jejich lapacích sítích (Peters 1987).

U nekribelátních pavouků vlákna malých ampulovitých žláz zesilují vlákna velkých ampulovitých žláz, např. u vlečných vláken nebo u radiálních vláken křížáků (Work 1981; Peters & Kovoor 1991). Jsou také důležitou složkou vlákna sloužícího k obalování ulovené kořisti, kde drží pohromadě díky produktu aciniformních žláz (La Mattina et al. 2008). Společně s dalšími typy vláken je nalezneme také ve

stabilimentu křížáků (Tillinghast et al. 1981). Nephilidae používají vlákna malých ampulovitých žláz pro konstrukci první, nelepivé spirály, po které se pavouk pohybuje během pokládání druhé, již lepivé spirály (Work 1981). V neposlední řadě jsou tato vlákna používána v kombinaci s aciniformními vlákny pro tvorbu přemostění mezi vzdálenými objekty (Peters 1990; Peters & Kovoov 1991).

### **Piriformní žlázy**

S výjimkou čeledi Plecteuridae a samců některých druhů čeledi Caponiidae (Platnick et al. 1991) jsou piriformní žlázy přítomny u všech araneomorfních pavouků. Obvykle jsou to malé početné žlázy hruškovitého tvaru (Mullen 1969; Kovoov 1977). U některých čeledí (Eresidae, Hersiliidae, Gnaphosidae, Oxyopidae, Araneidae) jsou ovšem také trubicovitě prodloužené (Kovoov & Muñoz-Cuevas 1998; Wolff et al. 2017), někdy i s krátkým tailem (Kovoov & Lopez 1983; Wolff et al. 2017).

Produktem piriformních žláz je vlákno s rychle tuhoucím lepivým obalem (Andersen 1970; Wolff et al. 2017). Piriformní vlákna slouží jako multifunkční stmelovací produkt. Pavouci jej používají pro přichycení vláken z ampulovitých žláz k substrátu, kdy pavouk pokryje konec těchto vláken shlukem piriformních vláken, tzv. připevňovacím diskem (Wolff et al. 2017). Dále jsou piriformní vlákna používána pro spojení dvou a více ampulovitých vláken (Work 1981). Piriformní vlákna také slouží jako nosiče feromonů (Richter & van der Kraan 1970). Díky kombinaci lepu a vláken slouží piriformní žlázy k tvorbě papíru podobným stěnám (Craig 1997). Tyto stěny se uplatňují v hnízdech sloužících k odpočinku, hibernaci, páření nebo ke kladení či strážení vajíček (Melchers 1963; Richter 1970; Kovoov & Zylberberg 1980). Taktéž se piriformní vlákna vyskytují ve vnější vrstvě kokonu (Richter 1970; Peters & Kovoov 1989; Peters 1993; Craig 1997). Tato vrstva je velice pevná a chrání vajíčka před specializovanými predátory (Hieber 1992). Pavouci čeledi Gnaphosidae využívají piriformní vlákna k lovu kořisti (Wolff et al. 2017). Obíhají kolem kořisti a pomocí piriformních vláken ze zvětšených piriformních žláz se jí snaží znehybnit. Pavouci rodu *Seothyra* (Eresidae), kteří obývají písčné duny, používají piriformní vlákna k zafixování částeczek písku během kopání nor (Peters 1992). Rod *Cyrtophora* má dokonce dva typy piriformních žláz (Kovoov & Lopez 1982). První typ slouží k přichycování vláken z velkých ampulovitých žláz k podkladu, druhý pak spojuje vlákna z malých ampulovitých žláz

přímo v síti. Pavouci čeledi Pholcidae mají s předními postranními snovacími bradavkami vedle velkých ampulovitých žláz asociovány další čtyři typy žláz, které pravděpodobně všechny vznikly specializací a diverzifikací piriformních žláz (Kovoor 1986). Taktéž u samců záředníka *Clubiona phragmitis* C.L. Koch, 1843 se z piriformních žláz vyvinul nový typ žláz (Wasowska 1969; Wiśniewsky 1986), pomocí kterých samci sprádaají úkryt pro páření a umístění kokonu.

### **Aciniformní žlázy**

Aciniformní žlázy jsou malé, velmi početné, lokalizované na zadních středních a postranních snovacích bradavkách téměř všech araneomorfních pavouků (Řezáč et al. in prep.). Obvykle jsou menší než piriformní žlázy (Kovoor 1972). Tvar je oválný (Kovoor 1972), u některých druhů mohou být ale i trubicovité (např. Tetragnathidae a Gnaphosidae; Kovoor 1974, 1990). U druhů, které produkují velké množství aciniformních vláken, jsou žlázy složeny z ampuly a krátkého tailu (např. Oxyopidae a Agelenidae; Kovoor & Muñoz-Cuevas 1998).

Aciniformní žlázy mají obvykle dvě sekreční zóny (Richter 1970; Kovoor 1977; Kovoor & Muñoz-Cuevas 1998), často se ale také vyskytuje pouze jedna (např. Araneidae, Gnaphosidae, Pholcidae; Kovoor 1977; Peters & Kovoor 1991). Ve výjimečných případech (Hypochilidae, Dysderidae) mohou mít až čtyři zóny (Glatz 1972; Kovoor 1977).

Aciniformní žlázy produkují široký pás složený z mnoha vláken, který je obvykle používán k pokrytí nejrůznějších objektů nebo k tvorbě stěny úkrytů. Společně s tubuliformními vlákny jsou používány v kokonech, obvykle na stavbu vnější pevné vrstvy (Kovoor 1984). U haplogynních pavouků, kde tubuliformní žlázy nejsou vyvinuty a počet aciniformních je redukován (např. Scytotidae a Pholcidae), kokon je také redukován pouze na několik vláken (Huber 2000). Aciniformní vlákna ve svazku společně s piriformními a ampulovitými vlákny jsou důležitou součástí pásů používaných na obalování kořisti (La Mattina et al. 2008). Pavouci čeledi Oecobiidae obíhají kořist a přichytávají ji k podkladu pomocí pásu aciniformních vláken (Glatz 1967). Aciniformní vlákna jsou také používána na stěny úkrytů, kde probíhá svlékání a kopulace (Richter 1970). Tato vlákna jsou dále používána na spermatické síťky (Melchers 1963; Richter 1970), stabilimenta u křižáků (Peters 1993) nebo společně s malými ampulovitými vlákny na přemostování vzdálených objektů (Peters 1990).



### **Tubuliformní žlázy**

Tubuliformní žlázy se vyskytují pouze u dospělých samic a produkují speciální vlákna sloužící k ochraně vajíček (Kovoor & Lopez 1983; Kovoor 1987). Vymizely u druhů, kde není potřeba zesílená ochrana snůšky (např. Salticidae a Clubionidae, kde samice snůšku chrání; Millot 1935). Otevírají se na zadních středních i postranních bradavkách. Obvykle jsou dlouhé a trubicovité, často také zbarvené dle barvy vlákna, které produkují (Mullen 1969; Kovoor 1972). Jsou tvořeny jednou sekreční zónou se silným epitelem (Mullen 1969; Kovoor 1972, 1977, 1990).

Tubuliformní žlázy se pravděpodobně vyvinuly specializací části aciniformních žláz. U primitivnějších skupin araneomorfních pavouků je kokon tvořen pouze aciniformními žlázami. U druhů, kde se tyto dva typy vyskytují společně, se aciniformní žlázy stále podílejí na tvorbě kokonu (Kovoor & Peters 1988).

Tubuliformní vlákna jsou dlouhá a přilnavá (Richter 1970). Zároveň jsou to nejsilnější vlákna v kokonu (Kovoor 1972; Stubbs et al. 1992). Jsou méně pevná a pružná než ampulovitá vlákna (Lucas 1964; Stauffer et al. 1994). Tubuliformní vlákna poskytují komplexní ochranu vajíčkům. Chrání je jak před specializovanými predátory s dlouhým ovipozitorem (Hieber 1992), tak před vodou (díky svým hydrofobním vlastnostem) a mechanickým poškozením (Kovoor 1977). Dále zajišťují snůšce ideální teplotní podmínky nebo ji svým zbarvením maskují před predátory (Schlinger & Hall 1959).

### **Kribelátní žlázy**

Jsou to nejmenší žlázy, které se svými drobnými spigoty otevírají na snovací destičce ležící před snovacími bradavkami (tzv. kribelum). Kribelum je struktura homologická s předními středními snovacími bradavkami (Eberhard 1980). Vlákna jsou ze spigotů kribelátních žláz vyčesávána speciální strukturou zvanou kalamistrum (řada štětín na ventrální straně metatarsálního segmentu na čtvrtém páru končetin; Eberhard 1980). Kribelátní vlákna slouží jako adhesivní složka kribelátních lapacích svazků. Jelikož jednotlivá vlákna jsou velmi tenká a jejich počet je obrovský, konečná přilnavost je tak velmi vysoká. Počet kribelátních žláz se liší mezi jednotlivými čeleděmi, od 50–60 u Leptonetidae (Ledford & Griswold 2010) po 16000–40000 in Eresidae (Kullman 1969). Kribelátní vlákna jsou velmi jemná a

musí být proto podepřena složitou strukturou dalších druhů vláken. Tato struktura obsahuje až další tři druhy vláken. Kostru pro kribelátní vlákna tvoří parakribelátní vlákna. Parakribelátní vlákna jsou fixována zvlněnými vlákny z malých ampulovitých žláz a tato vlákna ještě nakonec vlákny z pseudoflageliformních žláz. Obvykle se v tomto kribelátním systému vyskytují buď parakribelátní nebo ampulovitá vlákna, neboť jeden typ může druhý ve funkci zastoupit. Častá je absence pseudoflageliformních vláken (Řezáč et al. in prep.). Systém kribelátních žláz sloužících k lovu kořisti je považován za primitivní znak, vyskytuje se i u fylogeneticky nejprimitivnějších araneomorfních čeledí (Miller et al. 2012).

### **Parakribelátní žlázy**

Parakribelátní žlázy jsou asociovány se zadními středními snovacími bradavkami (Kovoor & Peters 1988), vzácně je lze nalézt také na zadních postranních bradavkách (Griswold et al. 2005). Histologicky jsou tyto žlázy podobné kribelátním, ale jsou dvakrát větší (Peters & Kovoor 1980; Kovoor & Peters 1988). Díky extrémně dlouhým parakribelátním spigotům je možná kombinace kribelátních a parakribelátních vláken (Kovoor & Peters 1988).

Funkce těchto žláz byla popsána u čeledi Uloboridae (Peters 1984), kde parakribelátní vlákna pojí dohromady pseudoflageliformní osová vlákna a kribelátní adhezivní vlákna. U druhů, kde jsou pseudoflageliformní vlákna nahrazena vlákny z malých ampulovitých žláz, pojí parakribelátní vlákna tato ampulovitá vlákna s kribelátními (Řezáč et al. in prep.).

### **Pseudoflageliformní žlázy**

Pseudoflageliformní žlázy jsou asociovány se zadními postranními snovacími bradavkami (Peters 1984, 1992). Vyskytují se u kribelátních pavouků a u nekribelátní nadčeledi Araneoidea (zde jsou však nazývány jako flageliformní) (Řezáč et al. in prep.). Pseudoflageliformní vlákna tvoří osová vlákna lapacích kribelátních pásů (Peters 1984).

### **Flageliformní žlázy**

Flageliformní žlázy jsou asociovány se zadními postranními snovacími bradavkami. Spigot této žlázy je umístěn mezi dvěma spigoty agregátních žláz na stejné snovací

bradavce. Toto uspořádání spigotů se nazývá triáda. Flagelifornní vlákno slouží jako axiální vlákno, na které je nanášen lep z agregátních žláz. Tento proces je umožněn právě díky efektivnímu uspořádání spigotů flagelifornních a agregátních žláz (Peters 1987; Craig 1997).

Flagelifornní vlákno je silně kontrahováno vodou z agregátního lepu, která vstupuje do vláken. Díky tomu je vlákno extrémně pružné (Mullen 1969; Denny 1976; Vollrath & Edmonds 1989) a je schopné se natáhnout až na pětinasobnou délku (Gosline et al. 1999).

U křížáků připomíná flagelifornní žláza stavbou ampulovité žlázy. Skládá se z dlouhého tailu, cylindrické ampuly a duktů s kličkou (Mullen 1969; Kovoov 1977). U Nephilidae je namísto dlouhého tailu žláza vybavená krátkými větvenými strukturami (Peters 1955). U Theridiidae a Linyphiidae jsou flagelifornní žlázy malé a jednoduché (Kovoov 1977).

### **Agregátní žlázy**

Agregátní žlázy jsou nejvíce specializovanými pavoučími snovacími žlázami (Kovoov 1977). Jsou asociovány se zadními postranními snovacími bradavkami (Kovoov 1972, 1977). Sekreční zóna u pavouků čeledi Araneidae a Nephilidae je laločnatá (Mullen 1969; Kovoov 1990). U Tetragnathidae a Linyphiidae je sekreční část tvořena jednoduchým vakem (Kovoov 1990; Peters & Kovoov 1991).

Produkt agregátních žláz slouží jako lep, který je nanášen na flagelifornní vlákno (viz výše). Původně uniformní povlak přitahuje atmosférickou vodu, bobtná, stává se nestabilním a rozpadá se na pravidelně rozptýlené kapičky, které jsou propojené velmi tenkou vrstvou tekutiny (Vollrath & Edmonds 1989; Vollrath & Tillinghast 1991; Edmonds & Vollrath 1992; Peters 1995). Rychlost tohoto procesu závisí na relativní vzdušné vlhkosti, při vyšší vlhkosti je rychlejší. Obvykle trvá několik minut (Vollrath 1994; Vollrath 2000). Ve středu každé kapičky se nachází vysoce adhezivní glykoprotein obalující flagelifornní vlákno (Vollrath et al. 1990; Vollrath & Tillinghast 1991; Tillinghast et al. 1993).

Pravidelné rozložení kapiček lepu v kombinaci se schopností glykoproteinu klouzat po flagelifornním vlákně umožňuje těsné přilnutí lapacího vlákna k povrchu kořisti. Krom adhezivní funkce zvyšuje produkt agregátních žláz elasticitu flagelifornního

vlákna (Higgins et al. 2001) a bývá také používán při balení kořisti do pavučiny (La Mattina 2008). Zajímavé využití se vyvinulo u rodu *Mastophora*, kde pavouk drží v předních končetinách vlákno, na jehož konci je umístěna kapička agregátního lepu. Toto uspořádání používá jako laso, které rozkmitá a na lep je schopen odchytit prolétající můry (Eberhard 1980; Yeorgan 1988). U čeledi Theridiidae došlo k morfologické a funkční přeměně jednoho páru agregátních žláz (Kovoor 1977; Řezáč et al. in prep.). Pomocí hřebene sét na zadních nohou dokáží pavouci umístit velké kapky paralyzujícího lepu na kořist či na predátora (Vetter 1980).

#### 4. Seznam použité literatury I

- Aisenberg, A. & W.G. Eberhard. 2009. Possible cryptic female choice in a spider: female cooperation in making a copulatory plug depends on male copulatory courtship. *Behavioral Ecology* 20: 1236–1241.
- Alberti, G. & C. Weinmann. 1985. Fine structure of spermatozoa of some labidognath spiders (Filistatidae, Segestriidae, Dysderidae, Oonopidae, Scytodidae, Pholcidae; Araneae; Arachnida) with remarks on spermiogenesis. *Journal of Morphology* 185(1): 1–35.
- Alberti, G., B. A. Afzelius & S. U. Lucas. 1986. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in bird spiders (Theraphosidae, Mygalomorphae, Araneae). *Journal of Submicroscopic Cytology* 18: 739–753.
- Alberti, G. 1990. Comparative spermatology of Araneae. *Acta Zoologica Fennica* 190: 17–29.
- Anatasiu-Dumitresco, M. 1941. Contributions à l'étude anatomique et cytologique de l'appareil séricigène des Araignées. Lère partie. *Analele Academiei Romane (Bucuresti) Memoriile Sectiunii Stiintifice, Seria* 3(16): 773–840.
- Andersen, S.O. 1970. Amino acid composition of spider silks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 35(3): 705–711.
- Apstein, C. 1889. Bau und Function der Spinndrüsen der Araneida. *Archiv für Naturgeschichte* 58: 29–74.
- Austadt, S. N. 1984. Evolution of sperm priority patterns in spiders . Pp. 223–249. *In Sperm Competition in the Evolution of Animal Mating Systems.* (Smith, R.L., ed.). Academic Press, New York.
- Ayoub, N.A., J.E. Garb, R.M. Tinghitella, M.A. Collin & C.Y. Hayashi. 2007. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PloS one* 2(6): e514.
- Bertkau, P. 1877. Über die Übertragungsorgane und die Spermatozoen der Spinnen. *Verhandlungen Naturhistorische Verein Preussischen Rheinlande und Westfalens* 34: 28–32.
- Braun, R. 1956. Zur Biologie von *Teutana triangulosa* (Walck.) (Araneae; Theridiidae, Asageneae). *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 159: 255–318.

- Bristowe, W.S. 1941. The Comity of Spiders, Vol. II. London: Ray Society. Pp. 414-460.
- Bristowe, W.S. 1958. The world of spiders. London: William Collins & Sons Ltd.
- Brown, S. C. 1985. Mating behavior of the golden-orb-weaving spider, *Nephila clavipes*. II. Sperm capacitation, sperm competition, and fecundity. *Journal of Comparative Psychology* 99: 167–175.
- Bruce, J.A. & J.E. Carico. 1988. Silk use during mating in *Pisaurina mira* (Walckenaer) (Araneae, Pisauridae). *Journal of Arachnology* 16: 1-4.
- Casem, M.L., L.P.P. Tran & A.M. Moore 2002. Ultrastructure of the major ampullate gland of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Tissue and Cell* 34(6): 427–436.
- Cooke, J.A., 1966. Synopsis of the structure and function of the genitalia in *Dysdera crocata* (Araneae, Dysderidae). *Senckenbergiana Biologica* 47: 35–43.
- Craig C.L. 1997. Evolution of arthropod silks. *Annual Reviews of Entomology* 42: 231–67.
- De Wilde, J. 1943. Some physical properties of the spinning threads of *Aranea diadema* L. *Archives Neerlandaises De Physiologie* 27: 117–132.
- Denny, M. 1976. The physical properties of spider's silk and their role in the design of orb-webs. *Journal of Experimental Biology* 65(2): 483–506.
- Dicko, C., F. Vollrath & J.M. Kenney. 2004. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules* 5(3): 704–710.
- Eberhard, W.G. 1980. Persistent stickiness of cribellum silk (*Uloborus diversus*). *Journal of Arachnology* 8: 283.
- Eberhard, W.G. 1980. The natural history and behavior of the bolas spider, *Mastophora dizzydeani* sp. n. (Araneae). *Psyche* 87(3-4): 143–170.
- Eberhard, W.G. 2004. Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. *Journal of Arachnology* 32: 545–556.
- Edmonds, D.T. & F. Vollrath. 1992. The contribution of atmospheric water vapour to the formation and efficiency of a spider's capture web. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 248(1322): 145–148.
- Foelix, R. 2011. *Biology of spiders*. Oxford University Press/Thieme, New York. Pp. 432.

- Foellmer, M.W. & D.J. Fairbairn. 2003. Spontaneous male death during copulation in an orb-weaving spider. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 183–185.
- Garb, J.E., N.A. Ayoub & C.Y. Hayashi. 2010. Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC Evolutionary Biology* 10(1): 243.
- Glatz, L. 1967. Zur biologie und morphologie von *Oecobius annulipes lucas* (Araneae, Oecobiidae). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 61(2): 185–214.
- Glatz, L. 1972. Der Spinnapparat haplogyner Spinnen (Arachnida, Araneae). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 72: 1–50.
- Gosline, J.M., P.A. Guerette, C.S. Ortlepp & K.N. Savage. 1999. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *Journal of Experimental Biology* 202(23): 3295–3303.
- Grimm, U. 1985. Die Gnaphosidae Mitteleuropas (Arachnida, Araneae). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg, (NF)* 26: 1–318.
- Griswold, C.E., M.J. Ramírez, J.A. Coddington & N.I. Platnick. 2005. Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae), with comments on their phylogeny. *Proceedings California Academy of Sciences, 4th Series* 56(Suppl. II): 1–324.
- Hayashi, C.Y., N.H. Shipley & R.V. Lewis. 1999. Hypotheses that correlate the sequence, structure and mechanical properties of spider silk proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* 24(2): 271–275.
- Herberstein, M.E., J.M. Schneider, G. Uhl & P. Michalik. 2011. Sperm dynamics in spiders. *Behavioral Ecology* 22: 692–695.
- Hieber, C.S. 1992. Spider cocoons and their suspension systems as barriers to generalist and specialist predators. *Oecologia* 91(4): 530–535.
- Higgins, L.E., M.A. Townley, E.K. Tillinghast, & M.A. Rankin. 2001. Variation in the chemical composition of orb webs built by the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Arachnology* 29(1): 82–94.
- Hopfmann, W. 1934. Bau und leistung des Spinnapparates einiger Netzspinnen. *Jeanaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* 70: 65–112.
- Huber, B.A. 2000. New World pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): a revision at generic level. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. Pp. 1–347.

- Huber B.A. 2005. High species diversity, male-female coevolution, and metaphyly in Southeast Asian pholcid spiders: the case of *Belisana* Thorell 1898 (Araneae: Pholcidae). *Zoologica* 155:1–126.
- Jäger, P. 2002. Über eine bemerkenswerte Verhaltensweise von *Scotophaeus scutulatus* (Araneae: Gnaphosidae). *Arachnol. Mitt.* 24: 72–75.
- Jarman, E.A. & R.R. Jackson. 1986. The biology of *Taieria erebus* (Araneae, Gnaphosidae), an araneophagic spider from New Zealand: silk utilisation and predatory versatility. *New Zealand Journal of Zoology* 13: 521–541.
- Knight, D.P. & F. Vollrath. 1999. Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266(1418): 519–523.
- Knight, D.P., M.M. Knight & F. Vollrath. 2000. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *International Journal of Biological Macromolecules* 27(3): 205–210.
- Knight, D.P. & F. Vollrath. 2002. Spinning an elastic ribbon of spider silk. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357(1418): 219–227.
- Knoflach, B. 1998. Mating in *Theridion varians* Hahn and related species (Araneae: Theridiidae). *Journal of Natural History* 32: 545–604.
- Knoflach, B. 2002. Copulation and emasculation in *Echinotheridion gibberosum* (Kulczynski, 1899) (Araneae, Theridiidae). Pp. 139–144. *In* European arachnology 2000. (Toft, S. & N. Scharff, eds.). Aarhus University Press, Aarhus.
- Knoflach, B. & S.P. Benjamin. 2003. Mating without sexual cannibalism in *Tidarren sisypoides* (Araneae, Theridiidae). *Journal of Arachnology* 31: 445–448.
- Knoflach, B. 2004. Diversity in the copulatory behaviour of combfooted spiders (Araneae, Theridiidae). *Denisia NF* 14:161–256.
- Kovoor, J. 1972. Étude histochimique et cytologique des glandes séricigènes de quelques Argiopidae. *Annales des Sciences Naturelles Zoologie* 14: 1–40.
- Kovoor, J. & L. Zylberberg. 1972. Morphologie et ultrastructure du canal des glandes ampullacees d'*Araneus diadematus* Clerck (Arachnida, Araneidae). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 128(2): 188–211.
- Kovoor, J. 1977. La soie et les glandes séricigènes des Arachnides. *Année Biologique* 16: 97–171.



- Kovoor, J. & L. Zylberberg. 1980. Fine structural aspects of silk secretion in a spider (*Araneus diadematus*). I. Elaboration in the pyriform glands. *Tissue and Cell* 12(3): 547–556.
- Kovoor, J. & A. Lopez. 1982. Anatomie et histologie des glandes séricigènes des *Cyrtophora* (Araneae, Araneidae): affinités et corrélations avec la structure et la composition de la toile. *Revue Arachnologique* 4: 1–21.
- Kovoor, J. & A. Lopez. 1983. Composition et histologie de l'appareil séricigène des *Argyrodes*, relations avec le comportement de ces araignées (Theridiidae). *Revue Arachnologique* 5: 29–43.
- Kovoor, J. 1984. Anatomie, histologie et affinités de l'appareil séricigène des *Hersilia* Sav. & Aud. (Araneae: Hersiliidae). *Canadian Journal of Zoology* 62: 97–106.
- Kovoor, J. 1986. Affinités de quelques Pholcidae (Araneae) décelables d'après les caractères de l'appareil séricigène. *Mémoires de la Société Entomologique de Belgique* 33: 111–118.
- Kovoor, J. 1987. Comparative structure and histochemistry of silk-producing organs in arachnids. Pp. 160–186. *In Ecophysiology of Spiders* (Nentwig, W., ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Kovoor, J. & H.M. Peters. 1988. The spinning apparatus of *Polonecia producta* (Araneae, Uloboridae): structure and histochemistry. *Zoomorphology* 108(1): 47–59.
- Kovoor, J. 1990. The silk-gland system in some Tetragnathinae (Araneae: Araneidae). Comparative anatomy and histochemistry. *Acta Zoologica Fennica* 190: 215–222.
- Kovoor, J. & A. Munoz-Cuevas. 1998. Structure and function of the silk-gland system in Oxyopidae (Araneae). Pp. 133–141. *In Proceedings of the 17th European Colloquium of Arachnology* (Selden, P.A., ed.). Edinburgh.
- Krejčí, T., M. Řezáč & P. Michalik. 2015. Female genital morphology and sperm storage in the velvet spider *Eresus kollari* (Araneae: Eresidae). *Journal of Arachnology* 43(2): 182–187.
- Kullmann, E. 1969. Spinnorgan mit 40000 “Düsen”. *Umschau* 3: 82–83.
- Kuntner, M., J.A. Coddington & G. Hormiga. 2008. Phylogeny of extant nephilid orb-weaving spiders (Araneae, Nephilidae): testing morphological and ethological homologies. *Cladistics* 24: 147–217.

- Ledford, J.M. & C.E. Griswold. 2010. A study of the subfamily Archoleptonetinae (Araneae, Leptonetidae) with a review of the morphology and relationships for the Leptonetidae. *Zootaxa* 2391(1): 1–32.
- Lucas, F. 1964. Spiders and their silks. *Discovery* 25: 2–26.
- Marusik, Y.M. & R.L. Crawford. 2006. Spiders (Aranei) of Moneron Island. Flora and Fauna Moneron Island. Mat Intern Sakkalin Island Project. Pp. 171–195.
- Mattina, C., R. Reza, X. Hu, A.M. Falick, K. Vasanthavada, S. McNary, et al. 2008. Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey wrapping silk in the cob weaver *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 47: 4692–4700.
- Melchers, M. 1963. Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. *Zoologische Jahrbücher für Systematische* 91: 1–90.
- Merrett, P. 1988. Notes on the biology of the neotropical pisaurid, *Ancylometes bogotensis* (Keyserling) (Araneae: Pisauridae). *Bulletin of the British Arachnological Society* 7: 197–201.
- Michalik, P., J. Haupt & G. Alberti. 2004. On the occurrence of coenospermia in mesothelid spiders (Araneae: Heptathelidae). *Arthropod Structure & Development* 33: 173–181.
- Michalik, P., W. Reiher, M. Suhm-Tintelnot, F.A. Coyle & G. Alberti. 2005. Female genital system of the folding-trapdoor spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): ultrastructural study of form and function with notes on reproductive biology of spiders. *Journal of Morphology* 263: 284–309.
- Michalik, P. 2007. Spermatozoa and spermiogenesis of *Liphistius* cf. *phuketensis* (Mesothelae, Araneae, Arachnida) with notes on phylogenetic implications. *Arthropod Structure & Development* 36: 327–335.
- Michalik, P. & M.J. Ramírez. 2014. Evolutionary morphology of the male reproductive system, spermatozoa and seminal fluid of spiders (Araneae, Arachnida) – current knowledge and future directions. *Arthropod Structure & Development* 43: 291–322.
- Miller, J., C. Griswold, N. Scharff, M. Řezáč, T. Szuts & M. Marhabaie. 2012. The velvet spiders: an atlas of the Eresidae (Arachnida, Araneae). *ZooKeys* 195: 1–144.

- Millot, J. 1935. Les glandes séricigènes des Salticides. Bulletin de la Société Zoologique de France 60: 501–510.
- Moon, M.J. 1998. Fine structural analysis of the silk-producing apparatus in wolf spider, *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). The Korean Journal of Entomology 28: 201–211.
- Mukherjee, S. & M.R. Heithaus. 2013. Dangerous prey and daring predators: a review. Biological Reviews 88: 550–563.
- Mullen, G.R. 1969. Morphology and histology of the silk glands in *Araneus sericatus* Cl. Transactions of the American Microscopical Society 88: 232–240.
- Murphy, J. 2007. Gnaphosid genera of the world. St Neots, Cambs, UK: British Arachnological Society.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. Annual Reviews of Entomology 19:61–80.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. Annales de la Société Entomologique de France (NS) 27: 123–128.
- Palmer, J.M. 1985. The silk and silk production system of the funnel-web mygalomorph spider *Euagrus* (Araneae, Dipluridae). Journal of Morphology 186(2): 195–207.
- Parker G.A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biological Reviews 45: 525–567.
- Peakall, D.B. 1969. Synthesis of silk, mechanism and location. American Zoologist 9(1): 71–79.
- Pekár, S., J.A. Coddington & T.A. Blackledge. 2012. Evolution of stenophagy in spiders (Araneae): evidence based on the comparative analysis of spider diets. Evolution 66: 776–806.
- Pekár, S. & S. Toft. 2015. Trophic specialisation in a predatory group: the case of prey-specialised spiders (Araneae). Biological Reviews 90: 744–761.
- Peters, H.M. 1955. Über den Spinnapparat von *Nephila madagascariensis* (Radnetzspinnen, Fam. Argiopidae). Zeitschrift für Naturforschung B 10(7): 395–404.

- Peters, H.M. & J. Kooor. 1980. Un complément à l'appareil séricigène des Uloboridae (Araneae): le paracribellum et ses glandes. *Zoomorphology* 96(1): 91–102.
- Peters, H.M. 1984. The spinning apparatus of Uloboridae in relation to the structure and construction of capture threads (Arachnida, Araneida). *Zoomorphology* 104(2): 96–104.
- Peters, H.M. 1987. Fine structure and function of capture threads. Pp. 187–202. *In* *Ecophysiology of spiders* (Nentwig, W., ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Peters, H.M. & J. Kooor. 1989. Die Herstellung der Eierkokons bei der Spinne *Polenecia producta* (Simon, 1873) in Beziehung zu den Leistungen des Spinnapparates. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 93(1): 125–144.
- Peters, H.M. 1990. On the structure and glandular origin of bridging lines used by spiders for moving to distant places. *Acta Zoologica Fennica* 190: 309–314.
- Peters, H.M. & J. Kooor 1991. The silk-producing system of *Linyphia triangularis* (Araneae, Linyphiidae) and some comparisons with Araneidae. *Zoomorphology* 111(1): 1–17.
- Peters, H.M. 1992. On the burrowing behaviour and the production and use of silk in *Seothyra*, a sand-inhabiting spider from the Namib Desert (Arachnida, Araneae, Eresidae). *Verhandlungen Naturwissenschaftlichen Vereins Hamburg (NF)* 33: 191–211.
- Peters, H.M. 1993. Über das problem der stabilitnente in spinnennetzen. *Zoologische Jahrbücher Physiologie*. 97: 245–64.
- Peters, H.M. 1995. Ultrastructure of orb spider's gluey capture threads. *Naturwissenschaften* 82(8): 380–382.
- Pitnick, S., T. Marrow & G.S. Spicer. 1999. Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution* 53(6): 1804–1822.
- Platnick, N.I. 1990. Spinneret morphology and the phylogeny of ground spiders (Araneae, Gnaphosoidea). *American Museum Novitates* 2978: 1–42.
- Platnick, N.I., J.A. Coddington, R.R. Forster & C.E. Griswold. 1991. Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). *American Museum Novitates* 3016: 1–76.
- Pouchkina, N.N., B.S. Stanchev & S.J. McQueen-Mason. 2003. From EST sequence to spider silk spinning: identification and molecular characterisation of

- Nephila senegalensis* major ampullate gland peroxidase NsPox. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33(2): 229–238.
- Raven, R.J. & K. Stumkat. 2005. Revisions of Australian ground-hunting spiders: II. Zoropsidae (Locosoidea: Araneae). *Memoirs of the Queensland Museum* 50: 347–423.
- Řezáč, M., S. Pekar & J. Johannesen. 2008. Taxonomic review and phylogenetic analysis of central European *Eresus* species (Araneae: Eresidae). *Zoologica Scripta* 37: 263–287.
- Řezáč, M., T. Krejčí, S. Goodacre, C.R. Haddad & V. Řezáčová. 2017. Morphological and functional diversity of minor ampullate glands and silk in spiders from the superfamily Amaurobioidea (Entelegynae: RTA clade). *Journal of Arachnology* 45: 198–208.
- Řezáč, M., T.A. Blackledge & P. Michalik. In prep. Morphology, function and evolution of spider silk glands – a review.
- Richter, C.J. & C. Van Der Kraan 1969. Silk production in adult males of the wolf spider *Pardosa amentata* (CL.) (Araneae, Lycosidae). *Netherlands Journal of Zoology* 20(3): 392–400.
- Richter, C.J. 1970. Morphology and function of the spinning apparatus of the wolf spider *Pardosa amentata* (Cl.) (Araneae, Lycosidae). *Zoomorphology* 68(1): 37–68.
- Richter, C.J.J. 1972. Production de soie, contenant probablement un pheromone, par males et femelles adultes de *Pardosa amentata*. *Proceedings of the 6th International Congress, Brno*. Pp. 227–237.
- Roberts, M.J. 1993. *The spiders of Great Britain and Ireland*, vol 1. Harley Books, Colchester. Pp. 229.
- Robinson, M.H. & B. Robinson 1973. Ecology and behavior of the Giant Wood Spider *Nephila maculata* (Fabricius) in New Guinea. *Smithsonian Contributions to Zoology* 149: 1–76.
- Schlinger, E.I. & J.C. Hall. 1959. A synopsis of the biologies of three imported parasites of the spotted alfalfa aphid. *Journal of Economic Entomology* 52(1): 154–157.
- Schulz, S. & S. Toft. 1993a. Branched long chain alkyl methyl ethers: a new class of lipids from spider silk. *Tetrahedron* 49(31): 6805–6820.

- Schulz, S. & S. Toft. 1993b. Identification of a sex pheromone from a spider. *Science* 260: 1635–1637.
- Simon, E. 1892–1903. Histoire naturelle des araignees. Roret, Paris 1: 1–1084.
- Sponner, A., W. Vater, S. Monajembashi, E. Unger, F. Grosse & K. Weisshart. 2007. Composition and hierarchical organisation of a spider silk. *PloS one* 2(10): e998.
- Stauffer, S.L., S.L. Coguill & R.V. Lewis. 1994. Comparison of physical properties of three silks from *Nephila clavipes* and *Araneus gemmoides*. *Journal of Arachnology* 22: 5–11.
- Strand, E. 1906. Studien über Bau und Entwicklung der Spinnen. I–III. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 80: 515–543.
- Stubbs, D.G., E.K. Tillinghast, M.A. Townley & N.A. Cherim. 1992. Fibrous composite structure in a spider silk. *Naturwissenschaften* 79(5): 231–234.
- Suhm, M. & G. Alberti. 1993. The fine structure of the spermatheca of *Amaurobius fenestralis* (Stroem, 1768) (Amaurobiidae, Araneae). *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali* 26: 343–353.
- Suhm, M., K. Thaler & G. Alberti. 1996. Glands in the male palpal organ and the origin of the mating plug in *Amaurobius* species (Araneae: Amaurobiidae). *Zoologischer Anzeiger* 234: 191–199.
- Swanson, B.O., T.A. Blackledge & C.Y. Hayashi. 2007. Spider capture silk: performance implications of variation in an exceptional biomaterial. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307(11): 654–666.
- Thiel, B.L., D.D. Kunkel & C. Viney. 1994. Physical and chemical microstructure of spider dragline: a study by analytical transmission electron microscopy. *Biopolymers* 34(8): 1089–1097.
- Tillinghast, E.K., E.J. Kavanagh & P.H. Kolbjornsen. 1981. Carbohydrates in the webs of *Argiope* spiders. *Journal of Morphology* 169(2): 141–148.
- Tillinghast, E.K., S.F. Chase & M.A. Townley. 1984. Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *Journal of Insect Physiology* 30(7): 591–596.
- Tillinghast, E.K., M.A. Townley, T.N. Wight, G. Uhlenbruck & E. Janssen. 1993. The adhesive glycoprotein of the orb web of *Argiope aurantia* (Araneae, Araneidae). *Materials Research Society, Symposium Proceedings* 292: 9–23.

- Uhl, G., 1994a. Genital morphology and sperm storage in *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75: 1–12.
- Uhl, G., 1994b. Ultrastructure of the accessory glands in female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75: 13–25.
- Uhl, G. 2000. Two distinctly different sperm storage organs in female *Dysdera erythrina* (Araneae: Dysderidae). *Arthropod Structure & Development* 29: 163–169.
- Uhl, G. & B. Gunnarsson. 2001. Female genitalia in *Pityohyphantes phrygianus*, a spider with a skewed sex ratio. *Journal of Zoology* 255(3): 367–376.
- Uhl, G., S. Nessler & J.M. Schneider. 2007. Copulatory mechanism in a sexually cannibalistic spider with genital mutilation (Araneae: Araneidae: *Argiope bruennichi*). *Zoology* 110: 398–408.
- Uhl, G., S.H. Nessler & J.M. Schneider 2010. Securing paternity in spiders? A review on occurrence and effects of mating plugs and male genital mutilation. *Genetica* 138(1): 75–104.
- Vetter, R.S. 1980. Defensive behavior of the black widow spider *Latrodectus hesperus* (Araneae: Theridiidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 7(3): 187–193.
- Viney, C., A.E. Huber, D.L. Dunaway, K. Kerkam & S.T. Case. 1994. Optical characterization of silk secretions and fibers. Pp. 120–136. *In* Silk polymers (Kaplan, D., W.W. Adams, B. Farmer, C. Viney, eds). Washington: American Chemical Society.
- Viney, C. 1997. Natural silks: archetypal supramolecular assembly of polymer fibres. *Supramolecular Science* 4(1-2): 75–81.
- Vöcking, O., G. Uhl & P. Michalik. 2013. Sperm dynamics in spiders (Araneae): ultrastructural analysis of the sperm activation process in the Garden Spider *Argiope bruennichi* (Scopoli, 1772). *PloS one* 8:e72660.
- Vollrath, F. & D.T. Edmonds. 1989. Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water. *Nature* 340(6231): 305–307.
- Vollrath, F., W.J. Fairbrother, R.J. Williams, E.K. Tillinghast, D.T. Bernstein, K.S. Gallagher & M.A. Townley. 1990. Compounds in the droplets of the orb spider's viscid spiral. *Nature* 345(6275): 526–528.

- Vollrath, F. & E.K. Tillinghast. 1991. Glycoprotein glue beneath a spider web's aqueous coat. *Naturwissenschaften* 78(12): 557–559.
- Vollrath, F., T. Holtet, H.C. Thøgersen & S. Frische. 1996. Structural organization of spider silk. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 263(1367): 147–151.
- Vollrath, F., D.P. Knight & X.W. Hu. 1998. Silk production in a spider involves acid bath treatment. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 265(1398): 817–820.
- Vollrath, F. & D.P. Knight. 1999. Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 24(2): 243–249.
- Vollrath, F. 2000. Strength and structure of spider's silks. *Reviews in Molecular Biotechnology* 74(2): 67–83.
- Vollrath, F. & D.P. Knight. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 410(6828): 541.
- Wasowska, S. 1969. Particularités de l'appareil séricigène des mâles *Clubiona phragmitis* C.L. Koch. *Zoologica Poloniae* 19: 505–515.
- Wilson, R.S. 1969. Control of drag-line spinning in certain spiders. *American Zoologist* 9(1): 103–111.
- Wisniewski, H. 1986. Studies on the spinning apparatus of *Clubiona phragmitis* C.L. Koch (Araneida, Clubionidae). II. The structure of the internal spinning apparatus. *Zoologica Poloniae* 33: 83–104.
- Wolff, J.O., M. Řezáč, T. Krejčí & S.N. Gorb. 2017. Hunting with sticky tape: Functional shift in silk glands of araneophagous ground spiders (Gnaphosidae). *Journal of Experimental Biology* 220: 2250–2259.
- Work, R.W. 1977. Mechanisms of major ampullate silk fiber formation by orb-web-spinning spiders. *Transactions of the American Microscopical Society* 96: 170–189.
- Work, R.W. 1981. Web components associated with the major ampullate silk fibers of orb-web-building spiders. *Transactions of the American Microscopical Society* 100: 1–20.
- World Spider Catalog. 2017. World spider catalog, version 18.0. Natural History Museum Bern. – Internet: <http://wsc.nmbe.ch> (August 10, 2017).



Yeargan, K.V. 1988. Ecology of a bolas spider, *Mastophora hutchinsoni*: phenology, hunting tactics, and evidence for aggressive chemical mimicry. *Oecologia*, 74(4): 524–530.

## 5. Výsledky disertační práce

- A. **Krejčí, T.**, M. Řezáč & P. Michalik. 2015. Female genital morphology and sperm storage in the velvet spider *Eresus kollari* (Araneae: Eresidae). *Journal of Arachnology* 43(2): 182–187.
- B. Řezáč, M., **T. Krejčí**, S. Goodacre, C.R. Haddad & V. Řezáčová. 2017. Morphological and functional diversity of minor ampullate glands and silk in spiders from the superfamily Amaurobioidea (Entelegynae: RTA clade). *Journal of Arachnology* 45(2): 198–208.
- C. Wolff, J.O., M. Řezáč, **T. Krejčí** & S.N. Gorb. 2017. Hunting with sticky tape: Functional shift in silk glands of araneophagous ground spiders (Gnaphosidae). *Journal of Experimental Biology* 220(12): 2250–2259.

## **A Female genital morphology and sperm storage in the velvet spider *Eresus kollari* (Araneae: Eresidae)**

**Tomáš KREJČÍ, Milan ŘEZÁČ & Peter MICHALIK**

**Journal of Arachnology 43(2): 182–187**

**Abstract.** In the present study, we examined the female genital system of a velvet spider (*Eresus kollari*) using light and electron microscopy. The female entelegyne genitalia of *E. kollari* comprises an epigyne with an anterior wide longitudinal bar and folds which are incurvated sideways. The anterior end of these folds corresponds to enlarged anterior bulges, which are connected to a distinct copulatory duct leading to lobular spermathecae. The anterior bulge is equipped with many large pores whereas the spermathecae has many small pores. At present, only a few studies focussed on the ultrastructure and possible function of adjacent epithelia in entelegyne genitalia of spiders revealing the presence of complex class 3 gland cells units around the spermathecae and ducts. Alternatively our analysis finds two different types of epithelia. The anterior bulge is equipped with class 3 gland cells whereas the spermathecae are surrounded by a putative transport epithelium. This epithelium is characterized by an extensive basal labyrinth, numerous mitochondria, and an invaginated cell apex with microvilli. The functions of the different parts are dubious, but the secretion produced by the class 3 cell glands in the anterior bulge could be involved in the transport of sperm by flushing a considerable quantity of secretion towards posterior. Alternatively, it could also contribute to the amorphous mass, which is formed during mating covering most of the epigyne. On the other hand, the epithelium around the spermathecae might only be involved in the alteration of the milieu in the spermathecal lumen but not contribute to the nutrition of spermatozoa during sperm storage.

**Keywords:** Spermatheca, copulatory duct, glandular unit, spermatozoa

### A.1. Introduction

In spiders, females often mate with more than one male and sperm is often stored in the sperm storage organs (usually spermathecae) until fertilization takes place (e.g., Schneider & Andrade 2011). The sperm storage organs are distinct sclerotized areas equipped with a glandular epithelium consisting of glandular units consisting of several cell types and a distinct canal for discharging glandular products - class 3 gland cell units (e.g., Suhm & Alberti 1993, 1996; Uhl 1994a, 2000; Michalik et al. 2005). Moreover, glands can be also present around the ducts that lead to the spermathecae (e.g., Ramirez 2014). However, the function of glandular products is not known. It was suggested that secretion plays a role in nutrition and activation of spermatozoa (e.g., Herberstein et al. 2011; Vöcking et al. 2011).

In general, two different types of female genitalia are known for spiders – haplogyne and entelegyne. In haplogyne genitalia the copulatory duct also serves as fertilization duct whereas in entelegyne genitalia distinct copulatory and fertilization ducts as well as a sclerotized plate (epigyne) are present (e.g., Uhl 2002). This fundamental difference led to the division of Araneomorphae into Haplogynae and Entelegynae (Simon 1892–1903), which is supported by several phylogenetic studies (e.g. Platnick et al. 1991; Griswold et al. 1999, 2005; Ramirez 2000).

Phylogenetically the most basal group of entelegynous spiders are velvet spiders (Eresidae) (summary in Miller et al. 2012). They are a small spider family with 96 species. Besides one exception they are restricted to the Old World and live as sit-and-wait predators. Prominent taxa including the genus *Stegodyphus*, which shows various degrees of sociality (e.g. Kraus & Kraus 1988; Johannesen et al. 2007), and the European species of the genus *Eresus*, named ladybird spiders due to the eye-catching coloration of the male opisthosoma. Considering the phylogenetic position within Entelegynae, Eresidae could be crucial for understanding of the evolution of entelegynous genitalia. Their female genitalia are conspicuous as no distinct copulatory openings are present in the epigyne. Instead the epigyne is characterized by longitudinal folds, which extend deeply and are connected to the internal part of the genitalia. According to Kraus & Kraus (1988) the vulva consists of three intergrading parts (anterior tips, an intermediate region, and posterior multilocular receptacular cavities). The anterior tips are located in front of the copulatory opening

(fold) and are equipped with glandular structures (Kraus & Kraus 1988). Interestingly, this part is somehow ambiguously defined. For example, Miller et al. (2012) named it “spermathecal head” whereas Řezáč et al. (2008) defined it as “copulatory ducts”. Certainly, this different terminology implies also different functions as copulatory ducts are used for the transport of sperm into the spermatheca whereas the spermathecal head as part of the spermatheca is likely related to sperm storage. In contrast, the spermathecae in the abovementioned studies resembles the receptacular cavities described by Kraus & Kraus (1988). However, it is not known where sperm storage takes place. Thus, we addressed following questions in this study: Where sperm is stored? What kind of epithelial tissue is associated with the sperm storage organ and how it differs from the epithelium associated with spermathecae? In order to answer these questions we investigated the female genital tract of *Eresus kollari* Rossi 1846 by means of light and electron microscopy.

## A.2. Methods

*Eresus kollari* Rossi, 1846 occurs mainly in rocky steppes of the alliance *Festucion valesiacae* in Central Europe (Řezáč et al. 2008). Spiders of this species spend most of their lives underground in well-camouflaged tube webs (Baumann 1997); their most common prey is beetles (Bellmann 1992; Kofler & Mildner 1993; Leist 1994; Baumann 1997; Walter 1999). We collected adult females after mating (indicated by the presence of a mating plug) from their burrows at three different localities in North Bohemia (Czech Republic) during September 2013: Ctiněves, Říp hill (50°23'2.986"N, 14°17'22.811"E); Obrnice, Zlatník hill (50°30'52.424"N, 13°42'54.487"E); Klapý, Hazmburk hill (50°25'59.093"N, 14°0'57.017"E). Voucher specimens are deposited in the Crop Research Institute, Prague (Czech Republic).

For scanning electron microscopy, the genitalia of five females were dissected and soft tissue was digested using Pancreatin (Álvarez-Padilla & Hormiga 2008). Specimens were dehydrated in graded acetone series, critical-point dried, sputter-coated with gold and examined under the JEOL JSM-7401F.

For light and transmission electron microscopy, genitalia of five females were dissected in a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4). Samples were post-fixed in osmium tetroxide for 2h, washed for another 1h and dehydrated in a graded series of acetone and then embedded in Spurr's resin (Spurr

1969). Semi-thin sections (1  $\mu\text{m}$ ) were cut with glass knives using a Leica UCT microtome, stained with toluidin blue and examined under a light microscope (Olympus CX41 with Olympus E510 IS digital camera). Ultrathin sections (80–160 nm) were cut with both glass knives and a diamond knife, stained with uranyl acetate, counterstained with lead citrate (Reynolds 1963) and examined using a JEOL JEM-1010 electron microscope.

### A.3. Results

The epigyne of *E. kollari* is depicted in Řezáč et al. (2008) and is characterized by an anterior wide longitudinal bar and folds which are incurvated sideways. The anterior end of these folds corresponds to the enlarged anterior bulge that is connected to a distinct copulatory duct (Fig. 1A). The copulatory opening is fold-like and situated posterior to the anterior bulge. The anterior bulge is equipped with numerous large pores (up to 10  $\mu\text{m}$ ) that are connected to a thick layer of the glandular epithelium (Figs. 1A, B, 2). The epithelium is composed of highly elongated gland units consisting of sheath, canal and secretory cells (Fig. 2). Most conspicuous are the canal cells, which are characterized by extensive microvilli and a thin-walled complex duct (Fig. 2A-C). The canal and secretory cells are surrounded by highly interdigitated sheath cells (Fig. 2A). The large pores may contain one or two cuticular ducts (Fig. 2D) that likely discharge glandular products into the bulge lumen. Numerous mitochondria and small vesicles are found in all cell types (Fig. 2). Secretory cells contain the largest number of small vesicles and a considerable number of large vesicles. Sheath cells are characterized by a large number of microtubules, bright cytoplasm, and carry no microvilli.

The spermathecae consist of lobes that vary in number, shape and size (Fig. 1). The cuticle of the spermathecae is perforated by a large number of small pores (0.1–3  $\mu\text{m}$ ). These pores connect to a conspicuous epithelium that is most developed in areas around the lobes and reaches a thickness of approximately 70  $\mu\text{m}$ . We could only detect one type of cell in the spermathecal epithelium, which is characterized by an extensively folded basal plasma membrane resulting in a prominent basal labyrinth (Figs. 3A, B). The basal labyrinth extends more than two third of the cell's height. The nucleus and some endoplasmic reticulum are located in the basal part of the cell. The cell apex is invaginated and bears numerous microvilli surrounding

extracellular space connecting to the spermathecal lumen through the pores (Figs. 3A, C, D). Thin extensions of the spermathecal cells extend into the pores and are characterized by numerous microtubules (Fig. 3E). The cells contain a high number of mitochondria, which can be oval-shaped or elongated (Figs. 3A-C). Moreover, small vesicles and bundles of microtubules are present (Fig. 3C).

In all studied specimen sperm was only present in the spermathecae but not in the anterior bulge. The spermatozoa were encapsulated and densely packed within the lobes of the spermathecae (Fig. 1D).

#### **A.4. Discussion**

*Eresus kollari* resemble the typical organization of eresid female genitalia with an epigyne characterized by two conspicuous folds leading into a tripartite vulva (Kraus & Kraus 1988). As sperm was always absent in the anterior bulge and only present in the lobulated spermathecae, we conclude that the bulge is not involved in sperm storage. Thus, the term “spermathecal head” used by Miller et al. (2012) is misleading as it implies some role in sperm storage. Whether the anterior bulge is somehow involved in the mating process cannot be answered based on our data. However, as already described by Kraus & Kraus (1988), the copulatory opening is located posteriorly to the anterior bulge and thus the bulge might not be involved in anchoring of the male genitalia. Other potential functions may be explained by the presence of the glandular epithelium around the anterior part of the bulge. We found numerous glandular units that resemble the class 3 gland organization according to the classification of Noirot & Quennedey (1974, 1991). This type of glandular units is typically found adjacent to sperm storage organs as it likely contributes products for the nutrition of spermatozoa (e.g., Uhl 1994a,b; Suhm & Alberti 1996; Uhl 2000; Berendonck & Greven 2005; Michalik et al. 2005; Useta et al. 2007). For example, Coyle et al. (1983) reported carbohydrates and glycogen for the spermathecal gland cells of some *Antrodiaetus* species. Because no spermatozoa are stored in the bulge, we hypothesize that the bulge secretion could be involved in the transport of sperm by flushing a considerable quantity of secretion towards posterior. Another possible function might be related to the amorphous mass that appears on the epigyne after copulation (Fig. 4). This amorphous mass consists of secretion and may resemble a mating plug as described for many different spider taxa (Uhl et al. 2010).

Interestingly, a mating plug was also reported for several species of another eresid genus, *Stegodyphus* (for example, figs 26 and 259 in Kraus & Kraus 1988). However, whether this mass really prevents consecutive matings must be addressed in future behavioural and genetic studies. Although males usually produce such plugs, a female contribution to the production of such mass could be possible and has been reported for several other entelegyne taxa (e.g., Knoflach 1998, 2004). Thus, future studies on eresid genitalia should consider a role of the anterior bulge in the production of the amorphous mass as a potential prevention of female remating.

Another peculiar feature of the female genital system of *E. kollari* is the spermathecal epithelium. As mentioned above, usually class 3 glands are present around the sperm storage organs of female spiders. Alternatively, Uhl (2000) reported another gland cell type for the female genitalia of the dysderid *Dysdera erythrina* (Walckenaer, 1802). In addition to the class 3 cells that occur on the anterior spermatheca, she reported class 1 gland cells to be present on the large posterior diverticulum. The occurrence of two different types of glands likely results in different sperm storage condition and is thus highly relevant to addressing the function of the different storage sites (Uhl 2000). However, the spermathecal epithelium of *E. kollari* does not consist of typical gland cells because only a few secretory droplets and endoplasmic reticulum are present. Instead, the cells are characterized by a very prominent basal labyrinth and numerous partly elongated mitochondria. Moreover, the cell apex is invaginated and bears numerous microvilli forming an apical complex. These features resemble the organization of transport epithelia, which are for example found in coxal and other complex glands (e.g., Rosenberg 1983; Alberti & Coons 1999; Rosenberg et al. 2006). The main function of transport epithelia is the transport of ions that may lead in the case of *E. kollari* to an alteration of the storage condition in the spermathecae. However, it is not clear how such change in the milieu in the lumen of the spermatheca affects the spermatozoa. Females of *E. kollari* store sperm for months, as mating occurs in early autumn but oviposition does not occur before spring. Because we only studied females during the mating season we do not know when sperm become active and whether spermatozoa need nutrients from the female to stay viable given they often contain glycogen and mitochondria (Michalik & Ramirez 2014). Sperm of *E. kollari* are encapsulated and very densely packed in the spermathecae and we could not



detect extensive amounts of secretion. Moreover, the timing of sperm activation varies depending on the species as shown for variety of spider taxa (Eberhard & Huber 1998; Useta et al. 2007; Vöcking et al. 2013) and thus a general inference cannot be made given present state of knowledge.

### **Acknowledgments**

The authors thank Martina Tesařová, Petra Masařová and Jiří Vaněček (Laboratory of Electron Microscopy, Czech Budweis) for help with electron microscopy. We thank Carsten Müller (Tuscon, Arizona, USA) and Jörg Rosenberg (Essen, Germany) for helpful discussions. This study was financially supported by the Internal Grant Agency of the Faculty of Environmental Sciences, CULS Prague (4211013123132). MŘ was supported by the Czech Ministry of Agriculture (project Mze RO0414).

### **A.5. Literature cited**

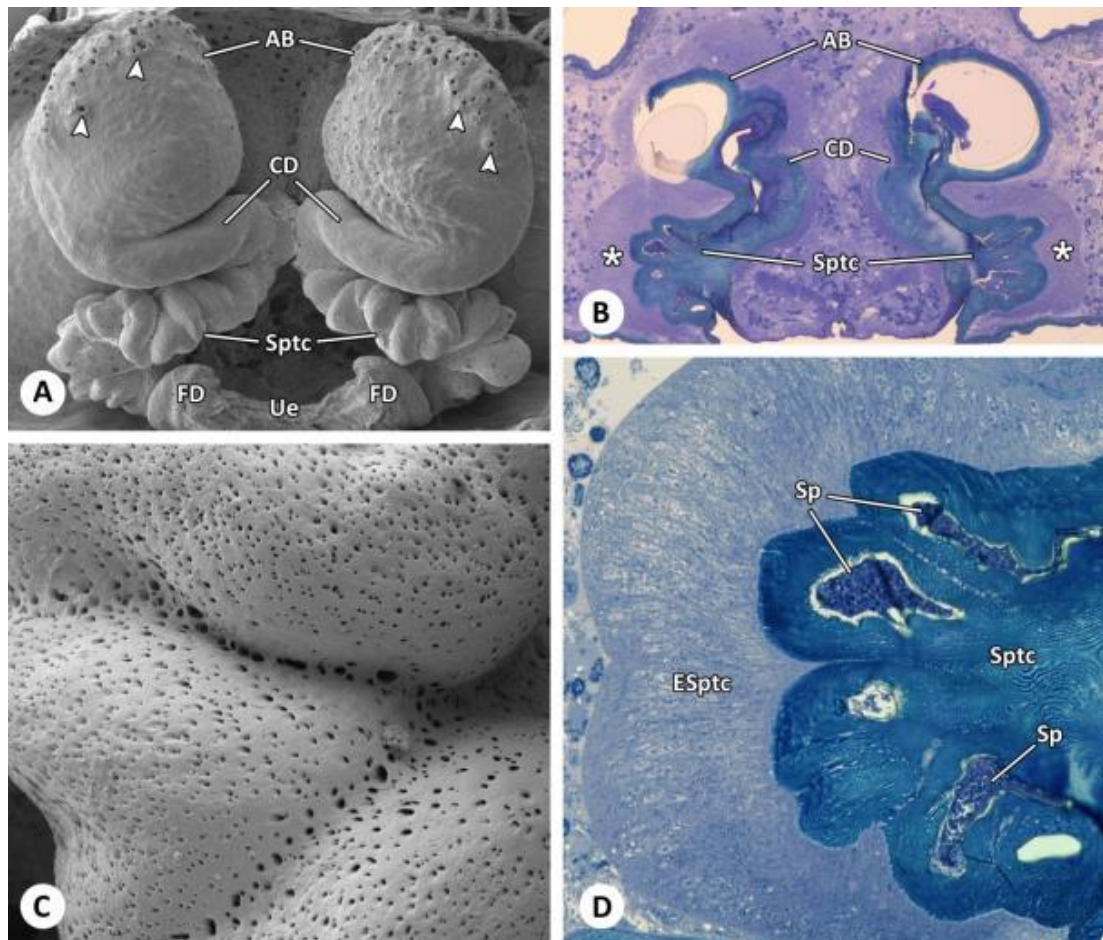
- Alberti, G. & L.B. Coons. 1999. Acari - Mites. Pp. 515–1265. *In* Microscopic Anatomy of Invertebrates (F.W. Harrison, ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Álvarez-Padilla, F. & G. Hormiga. 2008. A protocol for digesting internal soft tissues and mounting spiders for scanning electron microscopy. *Journal of Arachnology* 35: 538–542.
- Baumann, T. 1997. Populationsökologische und zönotische Untersuchungen zur Bedeutung von Habitatqualität und Habitatfragmentierung für Spinnenpopulationen auf Trockenrasen am Beispiel von *Eresus cinnaberinus* (Oliv. 1789). Ph.D. Dissertation, Universität Bremen, Germany.
- Bellman, H. 1992. Spinnen beobachten, bestimmen. Naturbuch Verlag, Augsburg.
- Berendonck, B. & H. Greven. 2005. Genital structures in the entelegyne widow spider *Latrodectus revivensis* (Arachnida; Araneae; Theridiidae) indicate a low ability for cryptic female choice by sperm manipulation. *Journal of Morphology* 263: 118–132.
- Coyle, F.A., F.W. Harrison, W.C. McGimse & J.M. Palmer. 1983. Observations on the structure and function of spermathecae in haplogyne spiders. *Transactions of the American Microscopical Societa* 102: 272–280.
- Eberhard, W.G. & B.A. Huber. 1998. Courtship, copulation, and sperm transfer in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae) with implications for the higher classification. *Journal of Arachnology* 26: 342–368.

- Griswold, C.E., J.A. Coddington, N.I. Platnick & R.R. Forster. 1999. Towards a phylogeny of entelegyne spiders (Araneae, Araneomorphae, Entelegynae). *Journal of Arachnology* 27: 53–63.
- Griswold, C.E., M.J. Ramírez, J.A. Coddington & N.I. Platnick. 2005. Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae) with comments on their phylogeny. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56: 1–324.
- Herberstein, M.E., J.M. Schneider, G. Uhl & P. Michalik. 2011. Sperm dynamics in spiders. *Behavioral Ecology* 22: 692–695.
- Johannesen J., Y. Lubin, D.R. Smith, T. Bilde & J.M. Schneider. 2007. The age and evolution of sociality in *Stegodyphus* spiders: a molecular phylogenetic perspective. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274: 231–237.
- Knoflach, B. 1998. Mating in *Theridion varians* Hahn and related species (Araneae: Theridiidae). *Journal of Natural History* 32: 545–604.
- Knoflach, B. 2004. Diversity in the copulatory behaviour of comb-footed spiders (Araneae, Theridiidae). Pp. 161–256. *In* Diversity and Biology of Spiders, Scorpions and other Arachnids (K. Thaler, ed.). Oberösterreichisches Landesmuseum, Linz.
- Kofler, A. & P. Mildner. 1993. Neues zur Röhrenspinne *Eresus niger* (Petagna) in Kärnten. *Carinthia II* 183: 127–131.
- Kraus, O. & M. Kraus. 1988. The genus *Stegodyphus* (Arachnida, Araneae). Sibling species, species groups, and parallel origin of social living. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* 30: 151–254.
- Leist, N. 1994. Zur Spinnenfauna zweier Binnendünen um Sandhausen bei Heidelberg (Arachnida: Araneae). *Beiheft Veröffentlichungen für Naturschutz und Landschaftspflege in Baden-Württemberg* 80: 283–324.
- Michalik, P., W. Reiher, M. Suhm-Tintelnot, F.A. Coyle & G. Alberti. 2005. Female genital system of the folding-trapdoor spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): ultrastructural study of form and function with notes on reproductive biology of spiders. *Journal of Morphology* 263: 284–309.
- Michalik, P. & M.J. Ramírez. 2014. Evolutionary morphology of the male reproductive system, spermatozoa and seminal fluid of spiders (Araneae,

- Arachnida) – current knowledge and future directions. *Arthropod Structure & Development* 43: 291–322.
- Miller, J., C. Griswold, N. Scharff, M. Řezáč, T. Szuts & M. Marhabaie. 2012. The velvet spiders: an atlas of the Eresidae (Arachnida, Araneae). *ZooKeys* 195: 1–144.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Reviews of Entomology* 19: 61–80.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annales de la Societé entomologique de France (NS)* 27: 123–128.
- Platnick, N., J.A. Coddington, R.R. Forster & C.E. Griswold. 1991. Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). *American Museum Novitates* 3016: 1–73.
- Ramírez, M.J. 2000. Respiratory system morphology and the phylogeny of Haplogyne spiders (Araenae, Araneomorphae). *Journal of Arachnology* 28: 149–157.
- Ramírez, M.J. 2014. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae: Araneomorphae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 390: 1–374.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Rosenberg, J. 1983. Coxal organs of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). Fine structural investigation with special reference to the transport epithelium. *Cell and Tissue Research* 230: 421–430.
- Rosenberg, J., C.H.G. Müller & G. Hilken. 2006. Ultrastructural organization of the anal organs in the anal capsule of *Craterostigma tasmanianus* Pocock, 1902 (Chilopoda, Craterostigmomorpha). *Journal of Morphology* 267: 265–272.
- Řezáč, M., S. Pekar & J. Johannesen. 2008. Taxonomic review and phylogenetic analysis of central European *Eresus* species (Araneae: Eresidae). *Zoologica Scripta* 37: 263–287.
- Schneider, J.M. & M.C.B. Andrade. 2011. Mating behavior and sexual selection. Pp. 215–275. *In Spider Behaviour: Flexibility and Versatility* (M.E. Herberstein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Simon, E. 1892–1903. *Histoire naturelle des araignees*. Roret, Paris 1: 1–1084.

- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31–43.
- Suhm, M. & G. Alberti. 1993. The fine structure of the spermatheca of *Amaurobius fenestralis* (Stroem, 1768) (Amaurobiidae, Araneae). *Bollettino dell' Accademia Gioenia di Scienze Naturali* 26: 343–353.
- Suhm, M. & G. Alberti. 1996. The fine structure of the spermatheca of *Pardosa lugubris* (Walckenaer, 1802). *Revue Suisse de Zoologie*, Volume hors série 2: 635–642.
- Uhl, G. 1994a. Genital morphology and sperm storage in *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75: 1–12.
- Uhl, G. 1994b. Ultrastructure of the accessory glands in female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75: 13–25.
- Uhl, G. 2000. Two distinctly different sperm storage organs in female *Dysdera erythrina* (Araneae: Dysderidae). *Arthropod Structure and Development* 29: 163–169.
- Uhl, G. 2002. Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). Pp. 145–156. *In* European arachnology 2000. (Toft, S. & N. Scharff, eds.). Aarhus University Press, Aarhus.
- Uhl, G., S.H. Nessler & J.M. Schneider. 2010. Securing paternity in spiders? A review on occurrence and effects of mating plugs and male genital mutilation. *Genetica* 138: 75–104.
- Useta, G., B.A. Huber & F.G. Costa. 2007. Preliminary data on spermathecal morphology and sperm dynamics in the female *Schizocosa maliciosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology* 104: 777–785.
- Vöcking, O., G. Uhl & P. Michalik. 2013. Sperm dynamics in spiders (Araneae): ultrastructural analysis of the sperm activation process in the Garden Spider *Argiope bruennichi* (Scopoli, 1772). *PLoS ONE* 8:e72660.
- Walter, J.E. 1999. Dürers Nashorn und die Nahrung von *Eresus cinnaberinus* (Olivier) (Araneae: Eresidae). *Arachnologische Mitteilungen* 17: 11–19.

## A.6. Figures

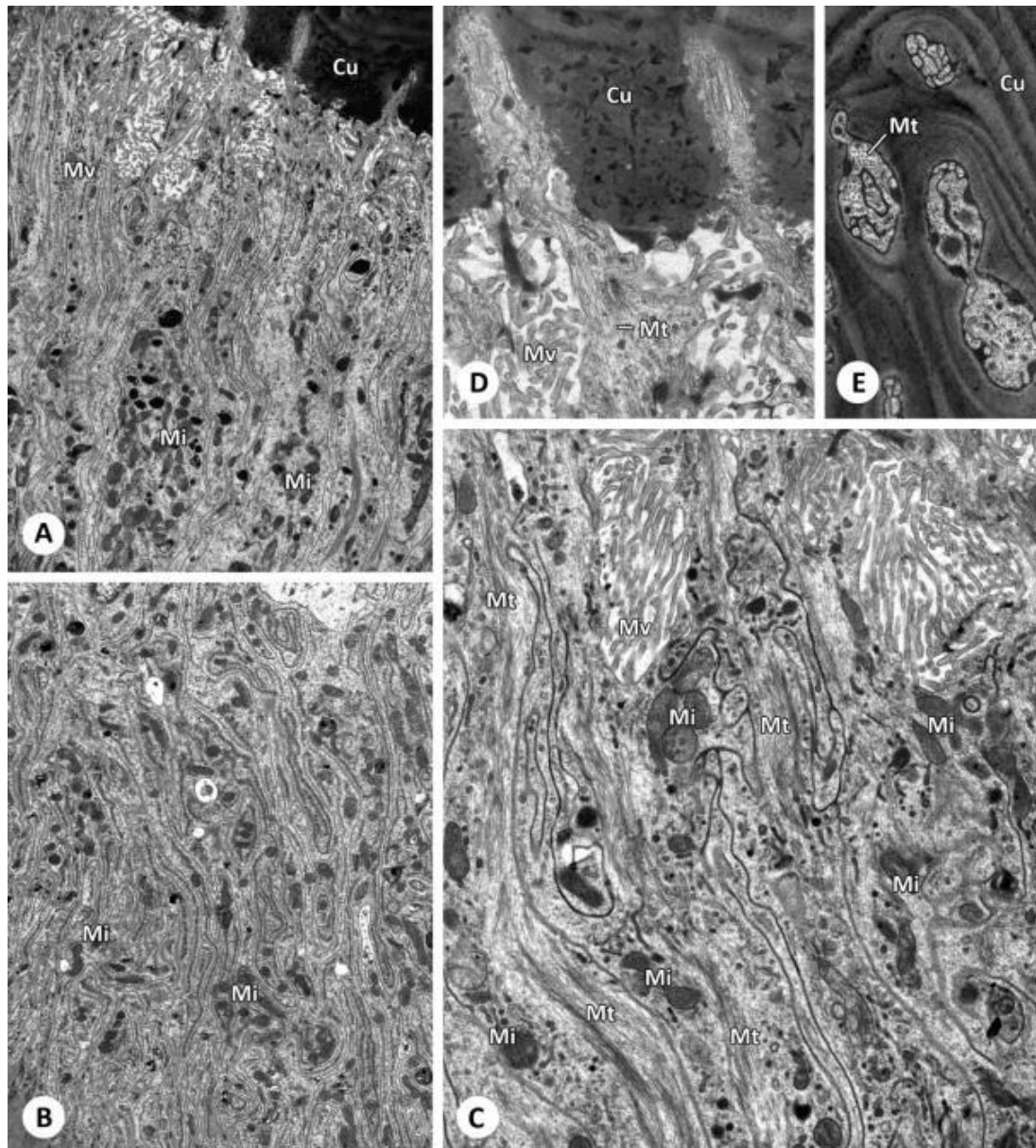


**Fig. 1.** Overview of the vulva. SEM and LM. A. Dorsal view of the vulva; B. Transversal section of the vulva (asterisk mark the spermathecal epithelium); C. Detail of the cuticle of the spermatheca; D. Section of the spermatheca.

AB, anterior bulge; CD, copulatory duct; ESptc, epithelium of spermatheca; FD, fertilization duct; Sp, spermatozoa; Sptc, spermatheca; Ue, uterus externus

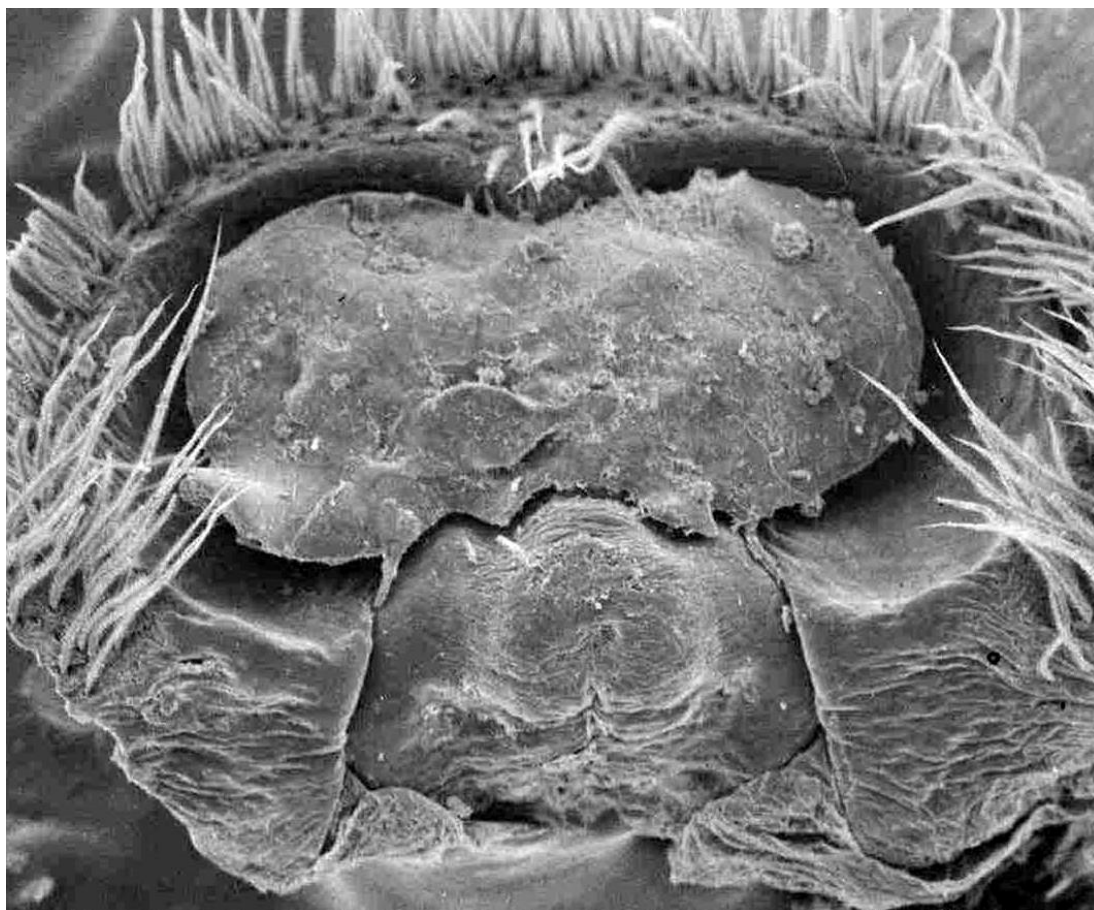


**Fig. 2.** Glandular epithelium of the anterior bulge. TEM. A. Overview of the region close to the cuticle showing several canal cells. B-C. Longitudinal and cross-section of the cuticular ducts in the canal cell. D. Cross section through a cuticular pore showing two canal cells with cuticular ducts. Ca, cuticular duct; CaC, canal cell; Cu, cuticle; Mv, microvilli



**Fig. 3.** Epithelium of spermathecae. TEM. A-B. Apical and basal region of the epithelium. The basal labyrinth is very prominent and mitochondria are present in high quantities. C-D. Apical part of the cell which is invaginated apex and bears numerous microvilli. The cells are connected by desmosomes and contain numerous mitochondria and bundles of microtubules. E. Cross-section through the cuticular pores showing the extension of the epithelial cell, which are characterized by numerous microtubules.

Cu, cuticle; Mi, mitochondria; Mt, microtubules; Mv, microvilli



**Fig. 4.** Ventral view of the epigyne after copulation showing the amorphous mass which covers large parts of the epigyne including the copulatory pores. Usually, the plug occurs only in anterior part of longitudinal folds. SEM.



**B Morphological and functional diversity of minor ampullate glands and silk in spiders from the superfamily Amaurobioidea (Entelegynae: RTA clade)**

**Milan ŘEZÁČ, Tomáš KREJČÍ, Sara GOODACRE, Charles R. HADDAD & Veronika ŘEZÁČOVÁ**

**Journal of Arachnology 45(2): 198–208**

**Abstract.** Minor ampullate glands produce fibres that are involved in construction of the complex adhesive band for capturing prey, which is produced by particular cribellate spiders. Despite such a specific role, however, the glands persist even in species where production of cribellate capturing bands no longer occurs. In these species, minor ampullate fibres are instead used to reinforce major ampullate fibers in draglines and capturing webs. The fibres are also used in combination with the aciniform fibrils to make silk for bridging lines – airborne lines used by spiders to allow them to move to points on the substrate where these threads adhere. In this study we compare the morphology of minor and major ampullate glands in related cribellate and ecribellate groups within spider families of the group traditionally termed the Amaurobioidea, which lies at the base of the RTA clade. We found that the minor ampullate glands are bifurcated in the cribellate members of this group, in particular in the representatives of the families Amaurobiidae, Titanoecidae, Desidae, Amphinectidae and Phyxelididae. In ecribellate representatives the major ampullate glands are never bifurcated. We found irregularly branched minor ampullate glands in some representatives of the family Agelenidae. In other ecribellates the glands are either unbranched or they are absent. Thus, bifurcation of the minor ampullate gland seems to be important in determining some aspect of cribellate capturing band formation that is as yet undetermined.

**Keywords:** Cribellate capturing threads, major ampullate, silk glands, spinnerets

## **B.1. Introduction**

Spiders exhibit a great diversity of silk gland types (Kovoor & Peters 1988). The glands produce silks with a range of different physical properties that are used for different functions. Most attention so far has been paid to the major ampullate glands and their silks. These glands are conspicuous in being the largest in size, and they produce long, thick fibers that are the toughest of all the silk fibers. Spiders use them for walking or dropping draglines, for constructing frames of webs, or as gossamer threads for ballooning (Foelix 2011). The major ampullate glands are usually the only large glands that open onto the anterior (anterior lateral) spinnerets of araneomorph spiders. The large glands that open onto the median (posterior median) spinnerets are called the minor ampullate glands because their morphology resembles that of the major ampullate glands but they are usually smaller in size.

In some cribellate spiders, minor ampullate glands produce fibers that form part of the complex adhesive band used for capturing prey. In this capturing band a mass of adhesive fibrils produced by cribellar glands is supported by products from three other gland types. The product of the paracribellar glands probably fixes the cribellate fibrils to the fibers from the minor ampullate glands. These fibers also act as springs, tending to contract the whole band (Peters 1987). The last component of the cribellate capturing band is the pair of axial fibers produced by the pseudoflagelliform glands, which open onto the posterior lateral spinnerets. The pseudoflagelliform fibers are straight because they are not combed out using the calamistrum on the hind legs. This is in contrast to products from the previously mentioned glands that open onto the cribellum and the posterior median spinnerets. The pseudoflagelliform glands are phylogenetically homologous to the flagelliform glands that produce the axial fibers of the sticky spiral of Araneoidea orb webs.

In contrast to the cribellar and paracribellar glands, which are always absent in ecribellate spiders, minor ampullate glands have not been lost in the majority of cases, even where species no longer produce the cribellate capturing band. Instead, the products of the minor ampullate gland have diversified to fulfil other functions. In spiders from the group Araneoidea they reinforce the major ampullate fibers in draglines or in construction elements of the webs (Work 1981; Peters & Kovoor 1991). In the family Theridiidae they have been found to be an important part of prey

wrapping silk, where they are held together by aciniform fibers (La Mattina et al. 2008). They are also present, together with other silk types, in orb web stabilimenta of *Argiope* (Tillinghast et al. 1981).

Spiders of the family Nephilidae use minor ampullate fibers to construct the first, nonadhesive spiral of the orb web (Work 1981). This first spiral is necessary for constructing the second, sticky spiral, which is laid by walking on the first one. In the Nephilidae, both spirals stay in the web, but in other orb weaving Araneoidea the spiders cut the first spiral out whilst completing the second (Work 1981). Spiders of the genus *Cyrtophora* (Araneidae) use only minor ampullate fibers for constructing the meshed-sheet-resembling orb web (Peters 1993). Finally, minor ampullate silk combined with aciniform fibrils is used for bridging lines in the Araneoidea (Peters 1990). Bridging lines are the airborne lines used by the spider for moving to distant places, once these threads have adhered to a substrate (Peters & Kovoov 1991).

The quantities produced and the physical properties of materials produced by silk glands depend on the size and morphology of each gland. The glands are composed of two main parts, the secretory part and the spinning duct. The secretory part is usually composed of two secretory zones that differ in their transparency and/or colour. They produce different products: the distal zone produces the core and the proximal one the coat of the fiber (Kovoov 1987). The secretory part is usually tubular (called the tail), and in those glands that are required to produce a large amount of silk very rapidly there is also a wide globular ampulla just before the spinning duct, for storing the silk precursor prior to usage (Kovoov 1987). The spinning duct processes the material from a liquid solution to the solid fiber. In ampullate glands it starts with a heavily sclerotised funnel, makes two switchbacks en route to the spinnerets to form a loop, and the three segments of the loop are all enveloped in a single sheath. The spider's silk glands open on the appendages at the posterior end of its abdomen (spinnerets) through hollow setae called spigots.

The glands that produce large amounts of silk dope usually have an elongated secretory part. However, in some spider groups the secretory part is branched rather than being simple and elongated. Thus far, bifurcated tail sections of minor ampullate glands have been found in *Amaurobius fenestralis* (Apstein 1889: plate 5, fig. 75) and *A. ferox* (Anatasiu-Dumitrescu 1941: plate 2, figs 4 and 5). Irregularly

branched tails of both the major and minor ampullate glands have also been found in some Agelenidae, such as *Eratigena atrica* (Kiesow-Starck 1932: figs 6–8 – under the name *Tegenaria atrium*; Kooor 1976, 1987) and *Agelena labyrinthica* (Apstein 1889: fig. 67; Kiesow-Starck 1932: figs 18 and 20). The precise gland morphology in the latter remains uncertain, however, because other studies have found simple ampullate glands in this species (Kooor 1976: fig. 1). Misidentification of the studied material, or observation of only some of the ampullate glands, might explain this apparent anomaly. Morphological features of the spinning glands are not mentioned in other studies of similar species, such as *A. limbata* (Park & Moon 2002). Irregularly branched tails in ampullate glands have also been found in *Tegenaria ferruginea*, although the results were erroneously presented under the name *T. domestica* in Johansson (1914) and Kiesow-Starck (1932: fig. 11). Notwithstanding uncertainty regarding species identity, the morphology of the silk glands is certainly variable even within the family Agelenidae. For example, simple ampullate glands have been found in other agelenid species such as *T. domestica* (Johansson 1914: fig. 5; Kiesow-Starck 1932: figs 12–14 – both authors refer to this species under the name *T. derhami*; Anastasiu-Dumitrescu 1941: figs 9–10).

The aim of this study is to compare the morphology of the minor ampullate glands in closely related cribellate and ecribellate groups of spiders, where the phylogenetic relationships indicate that the cribellate band has been lost more than once. These species come from within the Amaurobioidea, the monophyletic sister clade to the clade containing Dionycha and Lycosoidea (see fig. 5 in Miller et al. 2010, and fig. 1 in Garrison et al. 2016). We also compare these glands with the major ampullate glands within each species. We identified a bifurcated secretory part of the minor ampullate glands in cribellate spiders from the families Amaurobiidae, Titanoecidae, Desidae, Amphinectidae and Phyxelididae. Furthermore, we found ramified (more than two branches) secretory parts of both major and minor ampullate glands in some Agelenidae, a spider group that no longer has a cribellum (Miller et al. 2010). In other Agelenidae, Dictynidae, and also the studied outgroups of Amaurobioidea, Hersiliidae and Eresidae, the minor ampullate glands are simple, i.e. without bifurcation. In *Antistea* and *Cybaeus* (Hahniidae) and the studied representatives of Zodariidae, another outgroup of Amaurobioidea, the minor ampullate glands are

absent. We use our data to discuss the functional significance of bifurcation of the minor ampullate glands in cribellate spiders.

## B.2. Methods

The material studied (Table 1) includes representatives of ten spider families that are at the base of the RTA clade, the majority of which are usually included in the superfamily Amaurobioidea. We also studied representatives of the families Eresidae and Hersiliidae as outgroups to the RTA clade.

The spinning glands of fresh spiders were dissected in embryo dishes using physiological solution (0.9% aqueous solution of sodium chloride) and viewed under an Olympus SZX12 stereomicroscope. They were subsequently transferred in a drop of physiological solution onto a microscope glass slide with a small prefabricated circular impression and photographed under a Nikon Eclipse 80i light microscope. Voucher specimens are deposited in the Crop Research Institute, Prague (Czechia).

## B.3. Results

**Minor ampullate glands.**—We found no minor ampullate glands in *Zodarion*, *Psammorygma*, *Cybaeus*, and the species from the Hahniidae. In the majority of studied species only one pair of minor ampullate glands was present (Figs 1, 3C–E). More pairs were observed in outgroup species (Eresidae, Hersiliidae; also representatives of the clades Lycosoidea and Dionycha, which were not included in this study) and the Agelenidae. In the Agelenidae there were either two pairs of glands of almost the same size (*Agelenopsis*, Fig. 2L; *Coelotes*, Fig. 2A; *Wadotes*, Fig. 2B – here only one gland is shown; *Eratigena*, Figs 2H and 2I), or one large and two smaller ‘dwarf pairs’ (*Histopona*, *Tegenaria*, Figs 2C–G; *Agelena*, *Allagelena*, Figs 2J and 2K). Dwarf glands can easily be lost during dissection and are thus not always apparent (e.g. Fig. 2). A system consisting of three pairs of co-occurring glands has previously been shown to allow production of fibers, even during proecdysis (Townley et al. 1993).

The minor ampullate glands were found to possess two secretory zones in the studied species. The zones differed in visual parameters (transparency and colour). The proximal zone is usually smaller than the distal zone (e.g. Fig. 2D), although in

representatives of the agelenid subfamily Coelotinae (*Coelotes*, Fig. 2A; *Wadotes*, Fig. 2B) it is significantly larger.

The proximal portion of the secretory part is in some cases widened to form a storage ampulla (e.g. Figs 1D, 1H, 2E, 2H). The most proximal part of the ampulla is sometimes constricted (e.g. Figs 1D, 1F, 2E). In the majority of the studied species the minor ampullate glands have an unbranched tubular tail (Figs 2A–E and 3, Table 2), but in some species the tail is bifurcated (Fig. 1\*\*). One branch usually continues anteriorly in the axis of the gland (axial branch), whereas the second one grows to the side (side branch) and then it turns backwards, toward the spinneret (Figs 1A–G, 1I). The side branch is either shorter (Figs 1B, 1C, 1G) or of the same length as the axial branch (Figs 1D, 1F, 1H). In a minority of cases it is longer (Fig. 1I), and occasionally both branches protrude to the side (Fig. 1H). In *T. ferruginea* the tail has 2–3 branches in juveniles (Fig. 2F) and 3–4 branches in adult females, while in *Eratigena* and the primary glands of *Agelena* (Fig. 2J) and *Allagelena* it is multiply branched (Figs 2H, 2I, 2K). In some Amaurobiidae, Phyxelididae and Titanoecidae we found slight marks of additional branching (Figs 1A, 1B, 1F, 1I).

The spinning duct is usually relatively short and carries a short loop on its most distal part, close to the duct funnel, although in Dictynidae (Fig. 3D), Desidae (Fig. 1H) and some Amaurobiidae (Figs 1D–G) the loop is longer, covering more than one third of the distance between the funnel and the spinneret.

**Major ampullate glands.**—In contrast to the minor ampullate glands, the major ampullate glands are present in all the studied species. In the majority of species they are well developed, although there are exceptions, for instance in *Seothyra* (Eresidae) they are relatively small and are hidden within the piriform glands (Fig. 6A). There are three major ampullate glands attached to one anterior lateral spinneret: the first gland is large and functional, and the second is very small and reduced in size. The third gland is intermediate in size, ranging from almost the same size as the large gland (Figs 4D, 4F, 5H, 6B) to approximately the size of the small gland (Figs 4E, 4I, 5C, 5F). The major ampullate glands appear to possess two secretory zones. The zones differ in visual parameters such as transparency or colour, the B zone being lighter or darker than the A zone, or brownish. Zone A is always white or transparent. The observed colouration does not seem to be constant and probably

depends on the actual stage of epithelial cells in their secretory cycle (the height of the epithelial cells and presence of product droplets inside the cells changes during the cycle). The proximal zone (zone B) is always smaller than the distal zone (zone A), and constitutes less than one quarter of the length of the secretory part (Figs 4–6).

In the majority of the studied species the proximal portion of the secretory part is widened to form a storage ampulla (this was most apparent in *Tegenaria*, *Eratigena* and Desidae; Figs 4H, 5E, 5G–I). In a small number of cases the secretory part of the gland is a tube of uniform width (Eresidae, Hersiliidae; Figs 6A and 6B). In the majority of the studied species the major ampullate glands have an unbranched tubular tail. In some species it is slightly elongated (*Cicurina*, Fig. 6C), but in most of the others the elongation is extensive (most apparent, for example, in *Psammorygma*; Fig. 6G). In order to harbour the entire length of the tail in the limited space available in the abdomen, the tail is often undulated. In some *Tegenaria* species and in the family Desidae the tail is sparsely branched (Figs 4H, 5D–F), whereas in *Eratigena* and the primary glands of *Agelena* (Fig. 5J) and *Allagelena* the tail is densely branched (Figs 5H, 5I, 5K). The spinning duct of the major ampullate gland is relatively short and carries a short loop on its most distal part, which lies close to the duct funnel.

#### **B.4. Discussion**

We have shown that bifurcated minor ampullate glands are restricted almost exclusively to cribellate representatives of Amaurobioidea, *sensu* Garrison et al. (2016). The bifurcation might simply be a means through which more material can be produced, but the co-occurrence of cribellar glands with bifurcated minor ampullate glands suggests that bifurcation may be important for correct formation of the cribellate band structure.

A comparison between the morphology and function of the minor and major ampullate glands in cribellate and ecribellate Amaurobioidea spiders provides some insight. In the cribellate spiders that were studied the products of the major and minor ampullate glands presumably serve different functions. The major ampullate fibers are used for draglines, ballooning or construction of webs. The minor ampullate glands presumably produce undulating fibers supporting cribellate fibrils

in the adhesive bands for capturing prey (shown for Deinopidae and Eresidae – Peters 1992a, b).

The morphology of the major and minor ampullate glands in cribellate spiders was also found to differ – the major ampullate glands being simple (Fig. 4), in contrast to the bifurcated nature of their minor ampullate counterparts (Fig. 1). Bifurcation of the secretory part might produce a fiber that is asymmetric in its cross-section, with one side containing more product from the adjacent branch of the secretory part. The asymmetry of the fiber could enhance its undulating properties and/or could secure different adhesion forces on its different sides. The latter seems unlikely, since presumably the products of both branches are ensheathed by the product of the proximal portion of the secretory epithelium. Alternatively, the undulating of these fibers could also be caused simply by combing the cribellate band out using the calamistrum. If the bifurcation of the gland is an adaptation for the production of asymmetric fibers, the epithelium in the different branches, as well as their products, should differ. Furthermore, the sides of the resulting fiber should express different physical properties. We did not notice any visual differences (for example, different colouration or transparency) between the epithelium of particular branches (Fig. 1). Both branches contain transparent liquid crystalline material.

Surprisingly, we did not find any obvious reduction of the minor ampullate glands in adult males when compared with females and juveniles (compare scale bars in Figs 1D and 1E). Such a reduction might be expected, because adult males do not have functional cribellar glands, and thus cannot produce adhesive capturing bands (which are supported by fibers from the minor ampullate glands in females and juveniles). Our finding of unreduced, thus probably functional, minor ampullate glands in adult amaurobiid males suggests that minor ampullate fibers may fulfil some additional function in adult males.

Cribellar glands are believed to have been lost independently several times in spider evolution (Spagna & Gillespie 2008; Miller et al. 2010; Dimitrov et al. 2016). The species described in this study represent at least four cases of independent loss of the cribellum: two outgroups of Amaurobioidea – Hersiliidae (with the cribellate sister family Oecobiidae) and Zodariidae (with the cribellate sister family Penestomidae), and *Argyroneta* (ingroup of the otherwise cribellate Dictynidae) and the clade



composed of Agelenidae, Hahniidae and Cicuriniidae (sensu Murphy & Roberts 2015, with the cribellate sister family Dictynidae). In addition to the cribellar glands, the paracribellar glands and frequently also the pseudoflagelliform glands have been lost. In contrast, minor ampullate glands often remain in taxa that have lost their cribellum (see, for example, Griswold et al. 2005; Murphy & Roberts 2015). We studied representatives of two groups that have lost the minor ampullate glands independently, in particular Hahniidae (*Antistea*, *Cybaeus*) and some Zodariidae (*Zodarion*, *Psammorygma*). However, the spigots of the minor ampullate glands have been observed in some other Zodariidae (Ramirez 2014).

In contrast to cribellate spiders, in the ecribellate spiders and *Dictyna* that are studied here the products of the major and minor ampullate glands presumably serve the same respective functions, i.e. minor ampullate fibers are mainly used for reinforcing the major ampullate fibers in draglines or in construction elements of the webs, such as in species studied by Work (1981) and Peters and Kooor (1991). *Dictyna* produces cribellate capturing bands but they do not contain undulating fibers (Eberhard & Pereira 1993). Such undulating fibres are, however, found in some other dictynids, for example the genus *Mallos* (Griswold et al. 2005). It is thus not surprising that the morphology of these two gland types is almost identical in these spiders. In the family Agelenidae, this similarity also includes the presence of the system of three pairs of glands (i.e., three pairs of minor ampullate and three pairs of major ampullate glands), which, according to the findings of Townley et al. (1993) in *Araneus*, suggests that each of them function in different instars or at different times during the molt cycle (Townley et al. 1993). The two accessory pairs produce fibers during alternate proecdyses (i.e., one pair producing fibers in odd-numbered stadia, the other pair producing fibers in even-numbered stadia).

The presence of non-functional pairs of glands is also manifested in spinneret morphology. There could be a tartipore – a scar on new cuticle after the collared opening – that allows the ducts of the functional secondary ampullate gland to remain attached to the spigot on the old exoskeleton during proecdysis (Townley et al. 1993). The spigot of the last open secondary gland is replaced by a so-called nubbin in adults, i.e., the stage where the secondary ampullate glands are not necessary any more (Townley et al. 1993). Moulting spiders do not capture prey, thus the absence of this system in the studied cribellate spiders, where the minor

ampullate glands play a role in production of adhesive capturing bands, is not surprising. In contrast, in the Agelenidae the minor ampullate glands presumably play the same role as the major ampullate glands – their products might participate in draglines and shelters that are produced even during proecdysis.

Spiders of the family Agelenidae build relatively large horizontal sheet webs instead of producing cribellate bands in order to capture their prey. For such webs they need a large amount of silk. Therefore, it might have been advantageous for them to retain minor ampullate glands that have greater numbers of branches (Fig. 2F), thereby creating a larger surface area of secretory epithelium than the simple gland structures. Some species producing remarkably large webs, for example, the genus *Eratigena*, and primary glands of *Agelena* and *Allagelena*, appear to have further enlarged the secretory epithelium surface area through increasing the number of branches (Figs 2H, 2J, 2K). These branches probably produce the same product (potentially in contrast to cribellate relatives).

In the other representatives of this family branching is absent. In the species with simple glands that construct large webs (for example, some species of *Tegenaria*, and the genera *Agelenopsis* and *Histoipona*) the secretory epithelium is enlarged by elongation (Figs 2C–E).

Multiple branching of the secretory part of the minor and also the major ampullate glands in some Agelenidae is a unique feature among spider silk glands. Evolution of elongation instead of branching of the secretory part could have been driven by more advantageous rheology inside the simple glands. In order to decrease the energetic demands of spinning, spiders spin the fibers from the protein solution behaving as a liquid crystal (Knight & Vollrath 1999). The initially randomly oriented proteins aggregate end-to-end into rod-shaped units. Due to a very high concentration of the solution (up to 50% of proteins, Tillinghast et al. 1984), these rods interact by non-covalent forces. As a result, they orient themselves parallel to one another (Viney et al. 1994; Viney 1997). This phase flows as a liquid but maintains some molecular orientation of the crystal (Knight & Vollrath 1999). In branched glands, formation of the liquid crystal might be more complicated. From particular branches the differently oriented protein molecules flow together. In contrast, in simple glands the formation of the liquid crystal is not disturbed by flows from different directions, and

thus it is probably faster and more accurate. Therefore, in simple glands, the spinning is perhaps energetically less demanding.

The species from the agelenid subfamily Coelotinae have only very small funnel webs. They possess relatively small minor ampullate glands that significantly differ from the minor ampullate glands of other studied species by very short distal and very long proximal secretory zone (Figs 2A and 2B). Such glands probably produce fibers with a thin core and a thick outer coat. The ratio between the size of the proximal and the distal secretory zone resembles that of piriform glands that produce fibers covered by glue (Kovoor 1987). It is possible that the minor ampullate glands in the Coelotinae also produce adhesive fibers functionally substituting for cribellate capturing bands.

The mentioned conclusions are based only on our knowledge about the studied group of RTA spiders (Amaurobioidea in broad sense). Outside this group the morphological and functional features of the minor ampullate glands are different. For example, cribellate members of the Eresidae from the very base of araneomorph spiders also possess undulating fibers in the adhesive capturing bands, but the minor ampullate glands are simple (Fig. 3A). Simple minor ampullate glands are also observed in other cribellate, uloborid spiders (Kovoor 1977; Kovoor & Peters 1988), which are known for their orb webs with a cribellate spiral instead of a gluey one. However, in these cases their cribellate bands do not contain undulating fibers (Eberhard & Pereira 1993), and instead minor ampullate fibers are used, together with the major ampullate fibers, for frames of their orb webs (Peters 1983, 1984).

The phylogenetic relationships among the families at the base of the RTA clade are still very unclear. The difficulties with uncovering relationships of particular groups of this clade are caused by the conflict among characters (homoplasy) and the lack of informative synapomorphies. Many characters from spigot morphology, related to silk glands, have been already extensively used in phylogenetic analyses (for example, Griswold et al. 2005). However, internal silk gland morphology provides many more characters that might be informative for future phylogenetic analyses.

## Acknowledgments

We thank Rick Vetter for *Metaltella simoni* and Stano Pekár for *Phryganophorus candidus*, Richard A. Bradley for determining *Callobius bennetti* and *Wadotes calcaratus*, and Mark Townley and Martín Ramírez for valuable comments on the manuscript. Milan Řezáč was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports and the Czech Ministry of Agriculture (projects LH13042 and MZe RO0415). Tomáš Krejčí was supported by Internal Grant Agency of the Faculty of Environmental Sciences, CULS Prague (project 4211013123133); Veronika Řezáčová was supported by the long-term development program RVO61388971; Charles Haddad was supported by a National Research Foundation of South Africa (NRF) grant in the Competitive Funding for Rated Researchers programme (grant 95569).

## B.5. Literature cited

- Apstein, C. 1889. Bau und Function der Spinndrüsen der Araneida. Archiv für Naturgeschichte 1889: 29–74.
- Atanasiu-Dumitresco, M. 1941. Contributions a l'etude anatomique et cytologique de l'appareil sericigene des araignees. Analele Academiei Romane (Bucuresti) Memoriile Sectiunii Stiintifice, Seria 3 16: 773–840.
- Dimitrov, D., L.R. Benavides, M.A. Arnedo, G. Giribet, C.E. Griswold, N. Scharff, G. Hormiga. 2016. Rounding up the usual suspects: a standard target-gene approach for resolving the interfamilial phylogenetic relationships of cribellate orb-weaving spiders with a new family-rank classification (Araneae, Araneoidea). Cladistics doi: 10.1111/cla.12165.
- Eberhard, W.G. & F. Pereira. 1993. Ultrastructure of cribellate silk of nine species in eight families and possible taxonomic implications (Araneae: Amaurobiidae, Deinopidae, Desidae, Dictynidae, Filistatidae, Hypochilidae, Stiphidiidae, Tenggellidae). Journal of Arachnology 21: 161–174.
- Foelix, R.F. 2011. Biology of Spiders. Oxford University Press, New York.
- Garrison, N.L., J. Rodriguez, I. Agnarsson, J.A. Coddington, C.E. Griswold, C.A. Hamilton, M. Hedin, K.M. Kocot, J.M. Ledford, J.E. Bond. 2015. Spider phylogenomics: untangling the Spider Tree of Life. PeerJ 4:e1719

- Griswold, C.E., M.J. Ramírez, J.A. Coddington & N.I. Platnick. 2005. Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae) with comments on their phylogeny. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56: 1–324.
- Johansson, B. 1914. Zur Kenntnis der Spinndrüesen der Araneina. *Acta Universitatis Lundensis, Nova Series* 10(5): 1–12.
- Kiesow-Starck, I. 1932. Leistung und Bau des Spinnapparates einiger einheimischer Trichterspinnen. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* 66(1): 1–40.
- Knight, D.P. & F. Vollrath. 1999. Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 519–523.
- Kovoor, J. 1976. Caracteres adaptatifs et caracteres familiaux des glandes sericigenes dans le genre *Hippasa* E. Simon (Araneae, Lycosidae). *C.R. Arachnologie Fr., Les Eyzies* 83–96.
- Kovoor, J. 1977. L'appareil séricigène dans le genre *Uloborus* Latr. (Araneae, Uloboridae). I. Anatomie. *Revue Arachnologique* 1: 89–102.
- Kovoor, J. 1987. Comparative structure and histochemistry of silk-producing organs in Arachnids. Pp. 159–186. *In Ecophysiology of Spiders*. (W. Nentwig, ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Kovoor, J. & H.M. Peters. 1988. The spinning apparatus of *Polonecia producta* (Araneae, Uloboridae): structure and histochemistry. *Zoomorphology* 108: 47–59.
- La Mattina, C., R. Reza, X. Hu, A.M. Falick, K. Vasanthavada, S. McNary, et al. 2008. Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey wrapping silk in the cob weaver *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 47: 4692–4700.
- Miller, J.A., A. Carmichael, M.J. Ramírez, J.C. Spagna, C.R. Haddad, M. Řezáč, J. Johannesen, J. Král, X. Wang & C.E. Griswold. 2010. Phylogeny of entelegyne spiders: affinities of the family Penestomidae (new rank), generic phylogeny of Eresidae, and asymmetric rates of change in spinning organ evolution (Araneae, Araneoidea, Entelegynae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:786–804.
- Miller, J.A., C. Griswold, N. Scharff, M. Řezáč, T. Szuts & M. Marhabaie. 2012. The velvet spiders: an atlas of the Eresidae (Arachnida, Araneae). *ZooKeys* 194: 1–144.

- Murphy J.A. & M.J. Roberts. 2015. Spider Families of the World and Their Spinnerets. British Arachnological Society, York.
- Park, J.G. & M.J. Moon. 2002. Fine structural analysis of the silk apparatus in the funnel-web spider, *Agelena limbata* (Araneae: Agelenidae). Korean Journal of Entomology 32: 223–232.
- Peters, H.M. 1983. Struktur und Herstellung der Fangfäden cribellater Spinnen (Arachnida: Araneae). Ver Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg 26: 241–253.
- Peters, H.M. 1984. The spinning apparatus of Uloboridae in relation to the structure and construction of capture threads (Arachnida, Araneida). Zoomorphology 104: 96–104.
- Peters, H.M. 1987. Fine structure and function of capture threads. Pp. 187–202. *In* Ecophysiology of Spiders. (W. Nentwig, ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Peters, H.M. 1990. On the structural and glandular origin of the bridging lines used by spiders for moving to distant places. Acta Zoologica Fennica 190:309–314.
- Peters, H.M. 1992a. On the spinning apparatus and the structure of the capture threads of *Deinopis subrufus* (Araneae, Deinopidae). Zoomorphology 112: 27–37.
- Peters, H.M. 1992b. Über Struktur und Herstellung von Fangfäden cribellater Spinnen der Familie Eresidae (Arachnida, Araneae). Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg 33: 213–227.
- Peters, H.M. 1993. Functional organization of the spinning apparatus of *Cyrtophora citricola* with regard to the evolution of the web (Araneae, Araneidae). Zoomorphology 113: 153–163.
- Peters, H.M. & J. Kooor. 1991. The silk-producing system of *Linyphia triangularis* (Araneae, Linyphiidae) and some comparisons with Araneidae. Zoomorphology 111: 1–17.
- Ramírez, M.J. 2014. The morphology and phylogeny of dionychan spiders (Araneae: Araneomorphae). Bulletin of the American Museum of Natural History 390: 1–374.
- Spagna, J.C. & R.G. Gillespie. 2008. More data, fewer shifts: Molecular insights into the evolution of the spinning apparatus in non-orb-weaving spiders. Molecular Phylogenetics and Evolution 46: 347–368.

- Spagna, J.C., S.C. Crews & R.G. Gillespie. 2010. Patterns of habitat affinity and Austral/Holarctic parallelism in dictynoid spiders (Araneae: Entelegynae). *Invertebrate Systematics* 24: 238–257.
- Tillinghast, E.K., S.F. Chase & M.A. Townley. 1984. Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *Journal of Insect Physiology* 30: 591–596.
- Tillinghast, E.K., E.J. Kavanagh & P.H. Kolbjornsen. 1981. Carbohydrates in the webs of *Argiope* spiders. *Journal of Morphology* 169: 141–148.
- Townley, M.A., E.K. Tillinghast & N.A. Cherim. 1993. Moulting-related changes in ampullate silk gland morphology and usage in the araneid spider *Araneus cavaticus*. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 340: 25–38.
- Viney, C. 1997. Natural silks: archetypal supramolecular assembly of polymer fibres. *Supramolecular Science* 4: 75–81.
- Viney, C., A.E. Huber, D.L. Duvaway, K. Kerkam & S.T. Case. 1994. Optical characterization of silk secretions and fibers. Pp. 120–136. *In* *Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology*. (D. Kaplan, W.W. Adams, B. Farmer & C. Viney, eds). ACS Symposium Series, Vol. 544, American Chemical Society.
- Vollrath, F. & D.P. Knight. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 410: 541–548.
- Work, R.W. 1981. Web components associated with the major ampullate silk fibers of orb-web-building spiders. *Transactions of the American Microscopical Society* 100: 1–20.
- World Spider Catalog 2016. World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 17.5, accessed on 19 September 2016

## B.6. Tables

**Table 1.** The spider material studied. The classification to the families is after World Spider Catalog (2016) and *Cicurina*, *Argyroneta* and *Cybaeus* after Murphy & Roberts (2015).

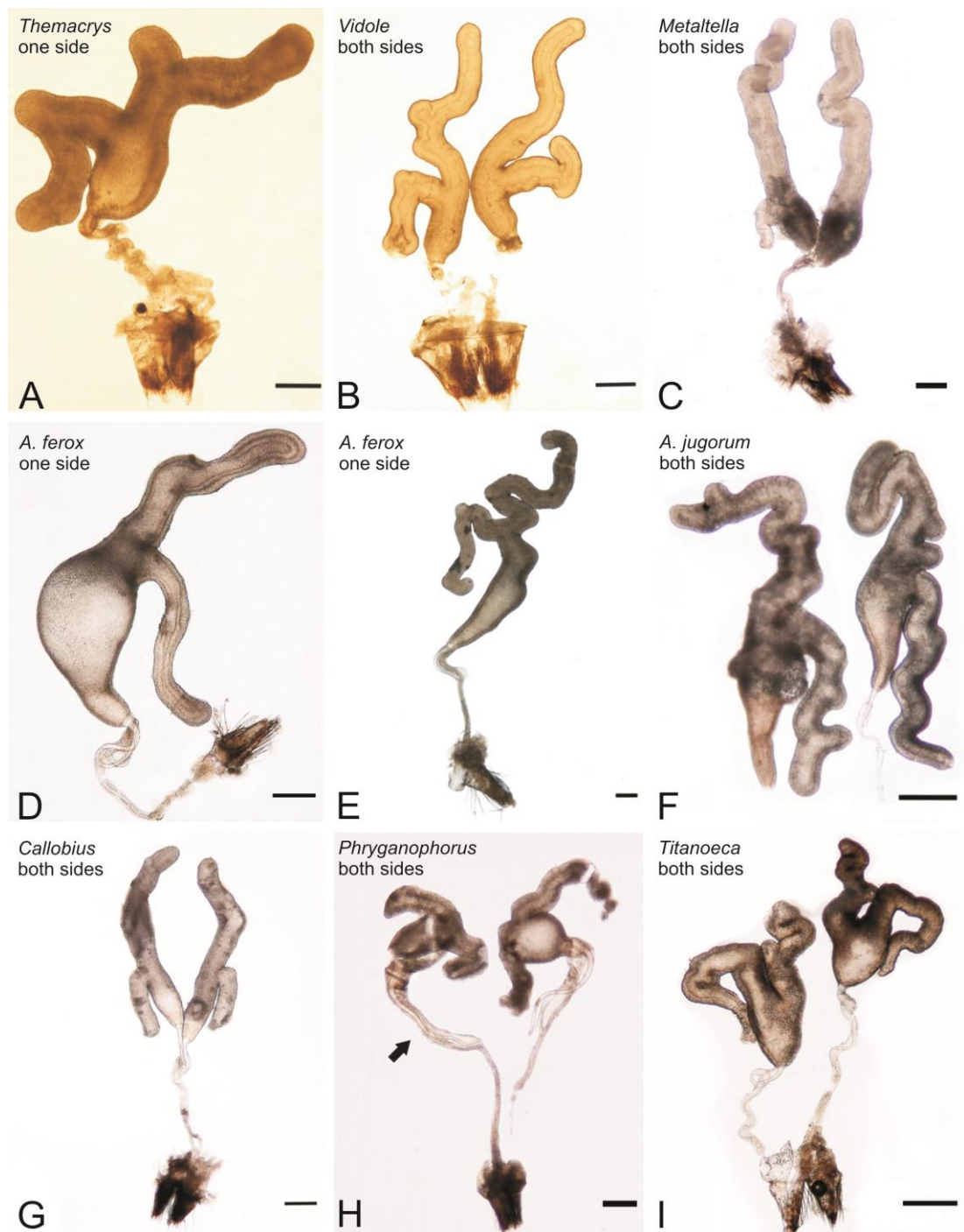
Family/Species	Higher taxon (after Miller et al. 2010)	Material	Date of dissection	Site
<b>Cribellum present</b>				
<b>Amaurobiidae</b>				
<i>Amaurobius fenestralis</i> (Stroem, 1768)	RTA: Amaurobioidea	3♂, 4♀	19 Nov 2015	Czechia: Hostivice
<i>Amaurobius ferox</i> (Walckenaer, 1830)		5♀	4 Dec 2014	Czechia: Bítov
<i>Amaurobius jugorum</i> L. Koch, 1868		4♀	3 Jun 2014	Czechia: Bítov
<i>Callobius bennetti</i> (Blackwall, 1846)		2♀	6 Jul 2014	USA: OH: Licking County, Dawes Arboretum
<b>Amphinectidae</b>				
<i>Metaltella simoni</i> (Keyserling, 1878)	RTA: Amaurobioidea	1 ♂, 1 ♀	6 Jul 2014	USA: CA: Riverside
<b>Desidae</b>				
<i>Phryganophorus candidus</i> (L. Koch, 1872)	RTA: Amaurobioidea	1 ♀	28 Jul 2014	Australia: Kinchega National Park
<b>Dictynidae</b>				
<i>Dictyna arundinacea</i> (Linné, 1758)	RTA: Amaurobioidea	2♀	18 May 2017	Czechia: Praha-Ruzyně
<i>Dictyna uncinata</i> Thorell, 1856		4♀	19 May 2015	Czechia: Praha-Ruzyně
<b>Eresidae</b>				
<i>Seothyra schreineri</i> Purcell, 1903	Outgroup of RTA	2♀, 2 juv.	15 Dec 2015	South Africa: Bankfontein
<b>Phyxelididae</b>				
<i>Themacrys silvicola</i> (Lawrence, 1938)	RTA: Amaurobioidea	2♀	3 Nov 2015	South Africa: Royal Natal National Park
<i>Vidole sothoana</i> Griswold, 1990		2♀	3 Nov 2015	South Africa: Amanzi Private Game Reserve
<b>Titanoecidae</b>				
<i>Titanoeca quadriguttata</i> (Hahn, 1833)	RTA: Amaurobioidea	4♀	6 Jun 2014	Czechia: Havraníky
<i>Titanoeca schineri</i> L. Koch, 1872		2♀	6 Jun 2014	Czechia: Hodonín
<b>Cribellum absent</b>				
<b>Agelenidae</b>				
<i>Agelena labyrinthica</i> (Clerck, 1757)	RTA: Amaurobioidea	1♀	13 Jul 2016	Czechia: Praha-Ruzyně
<i>Agelenopsis pennsylvanica</i> (C.L. Koch, 1843)		2♀	10 Sep 2009	USA: OH: Akron
<i>Allagelena gracilens</i> (C. L. Koch, 1841)		1♀, 5 juv.	12 Jul 2016	Czechia: Valtice
<i>Coelotes terrestris</i> (Wider, 1834)		4♀, 2 juv.	19 Nov 2014	Czechia: Podmolí
<i>Eratigena agrestis</i> (Walckenaer, 1802)		5♀	18 Nov 2014	Czechia: Lukov
<i>Eratigena atrica</i> (C. L. Koch, 1843)		5♀	5 Jun 2014	Czechia: Hostivice
<i>Histopona torpida</i> (C. L. Koch, 1837)		4♀	18 Nov 2014	Czechia: Lukov
<i>Tegenaria campestris</i> C. L. Koch, 1834		4♀	18 Nov 2014	Czechia: Lukov
<i>Tegenaria domestica</i> (Clerck, 1757)		3♀	6 Jun 2014	Czechia: Znojmo
<i>Tegenaria ferruginea</i> (Panzer, 1804)		5 juv., 2♀	7 Dec 2015	Czechia: Praha-Ruzyně
<i>Tegenaria silvestris</i> L. Koch, 1872		4♀	4 Nov 2015	Slovenia: Orehek, Žegnana jama
<i>Wadotes calcaratus</i> (Keyserling, 1887)		2♀	13 Jul 2014	USA: OH: Licking County, Dawes Arboretum
<b>Dictynidae</b>				
<i>Argyroneta aquatica</i> (Clerck, 1757)	RTA: Amaurobioidea	1 ♂, 5♀	5 Nov 2014	Czechia: Doksy
<b>Cicurinidae</b>				
<i>Cicurina cicur</i> (Fabricius, 1793)	RTA: Amaurobioidea	4♀	21 May 2015	Czechia: Praha-Ruzyně
<b>Hahnidae</b>				
<i>Antistea elegans</i> (Blackwall, 1841)	RTA: Amaurobioidea	7♀	4 Oct 2016	Czechia: Staré Splavy
<i>Cryphoea silvicola</i> (C. L. Koch, 1834)		1♂	4 Oct 2016	Czechia: Pec pod Sněžkou
<i>Cybaeus angustiarum</i> L. Koch, 1868		5♀	19 Sep 2015	Czechia: Pec pod Sněžkou
<b>Hersiliidae</b>				
<i>Tyrotama australis</i> (Simon, 1893)	Outgroup of RTA	2♀, 1 juv.	15 Dec 2015	South Africa: Bankfontein
<b>Zodariidae</b>				
<i>Psammorygma</i> sp.	RTA: outgroup of Amaurobioidea	2♂, 2♀	13 Jan 2016	South Africa: Ndumo Game Reserve
<i>Zodarion germanicum</i> (C. L. Koch, 1837)		1 ♂, 2♀	21 May 2015	Czechia: Praha-Liboc



**Table 2.** The morphological features of the minor ampullate glands of studied spider species from representatives of the RTA clade and its outgroups. The term "variable" characterizing the length of branches means intraspecific variation in this character. x – the character is irrelevant in the species

Family/Species	Shape of tail	Length of branches	Direction of shorter branch	Ampulla	Constriction of ampulla close to duct funnel	No. of MiAG spigots in ♀ (Murphy & Roberts 2015; Miller et al. 2012)	No. of undulating lines (Eberhard & Pereira 1993; Griswold et al. 2005)	Reference to figure
<b>CRIBELLUM PRESENT</b>								
<b>Amaurobiidae</b>						1	1	
<i>Amaurobius fenestralis</i>	Bifurcated	Almost same	Toward spinneret	Inconspicuous	Absent			
<i>Amaurobius ferox</i>	Bifurcated	Almost same	Toward spinneret	Obvious	Present			1D-E
<i>Amaurobius jugorum</i>	Bifurcated	Almost same	Toward spinneret	Inconspicuous	Present			1F
<i>Callobius bennetti</i>	Bifurcated	One significantly shorter	Toward spinneret	Absent	Absent			1G
<b>Amphinectidae</b>							1	
<i>Metaltella simoni</i>	Bifurcated	One significantly shorter	Toward spinneret	Absent	Absent		0–1	1C
<b>Desidae</b>						1	0 ( <i>Paramatachia</i> ) –1 ( <i>Badumna</i> )	
<i>Phryganophorus candidus</i>	Bifurcated	Almost same	To the sides	Obvious	Present			1H
<b>Dictynidae</b>						1	0 ( <i>Dictyna</i> )–1 ( <i>Mallos</i> )	
<i>Dictyna arundinace, uncinata</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			3D
<b>Eresidae</b>						1–4	3–4 ( <i>Stegodyphus</i> )	
<i>Seothyra schreineri</i>	Unbranched	x	x	Present	Inconspicuous			3A
<b>Phyxelididae</b>						1	1	
<i>Themacrys silvicola</i>	Bifurcated	Almost same	Toward spinneret	Absent	Absent			1A
<i>Vidole sothoana</i>	Bifurcated	One significantly shorter	Toward spinneret	Absent	Absent			1B
<b>Titanoecidae</b>							1	
<i>Titanoeca quadriguttata</i>	Bifurcated	Almost same	To the front	Inconspicuous	Absent			1H
<i>Titanoeca schineri</i>	Bifurcated	Almost same	To the front	Inconspicuous	Absent			
<b>CRIBELLUM ABSENT</b>								
<b>Agelenidae</b>						1–2	0	
<i>Agelena labyrinthica</i>	10 pairs irregularly branched, 20 pairs unbranched	Variable	x	Present	Absent			2J
<i>Agelenopsis pennsylvanica</i>	Unbranched	x	x	Obvious	Present			2L
<i>Allagelena gracilens</i>	10 pairs irregularly branched, 20 pairs unbranched	Variable	x	Present	Absent			2K
<i>Coelotes terrestris</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			2A
<i>Eratigena agrestis</i>	Irregularly branched	Variable	x	Obvious	Absent			2H
<i>Eratigena atrica</i>	Irregularly branched	Variable	x	Obvious	Absent			2I
<i>Histopona torpida</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			2C
<i>Tegenaria campestris</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			2D
<i>Tegenaria domestica</i>	Unbranched	x	x	Present	Present			2G
<i>Tegenaria ferruginea</i>	Irregularly branched	Variable	x	Absent	Inconspicuous			2F
<i>Tegenaria silvestris</i>	Unbranched	x	x	Present	Present			2E
<i>Wadotes calcaratus</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			2B
<b>Dictynidae</b>						1	0	
<i>Argyroneta aquatica</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			3E
<b>Cicurinidae</b>						0 ( <i>Cryphoea</i> )– 1 ( <i>Cicurina</i> , <i>Tubertia</i> , <i>Mastigusa</i> )	0	
<i>Cicurina cicur</i>	Unbranched	x	x	Absent	Absent			3C
<b>Hersiliidae</b>						1 ( <i>Hersiliola</i> )– 2 ( <i>Hersilia</i> )	0	
<i>Tyrotama australis</i>	Unbranched	x	x	Absent	Present			3B

**B.7. Figures**



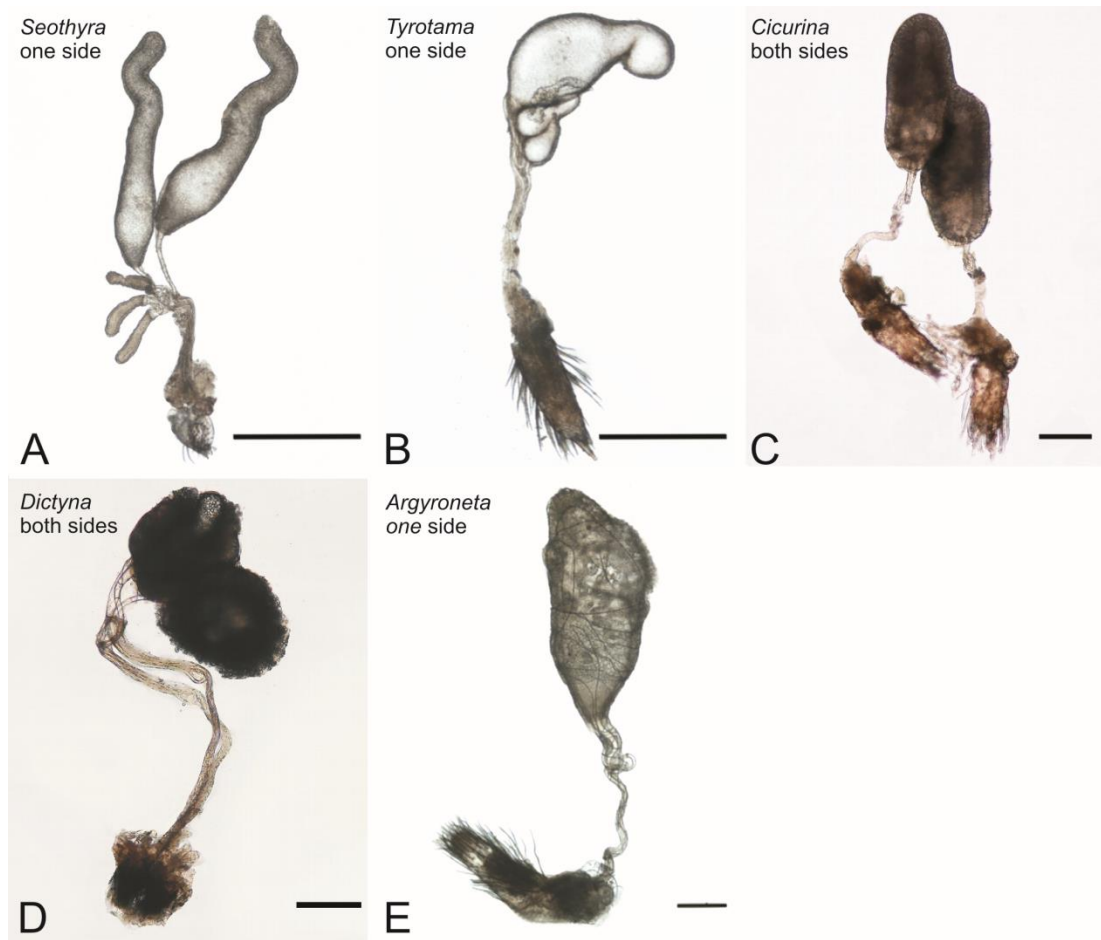
**Fig. 1.** Bifurcated minor ampullate glands of cribellate representatives of the superfamily Amaurobioidea. Either „one side“ or „both sides“ of the abdomen, split medially, are depicted. A, *Themacrys silvicola*, female, the side branch is approximately the same length as the axial one, apparent is the additional branching; B, *Vidole sothoana*, female, the side branches are slightly shorter than the axial one, the side branch of the left gland is unusually turned to the front, apparent is the additional branching; C, *Metaltella simoni*, female, the ampulla is completely missing, the proximal secretory zone is much darker than the distal one, the side branches are much smaller than the axial

ones, the side branch of the right gland is not seen because it is behind the axial one; D, *Amaurobius ferox*, female, the ampulla and the constriction proximally from it are apparent, the side branch is approximately the same length as the axial one; E, *Amaurobius ferox*, male, in comparison with the conspecific female the storage ampulla is smaller, but besides that other reductions are not apparent; F, *Amaurobius jugorum*, female, apparent is the constriction proximally from the ampulla, the side branch is approximately the same length as the axial one, apparent is the additional branching; G, *Callobius bennetti*, female, the ampulla is completely missing, the side branches are shorter than the axial ones; H, *Phryganophorus candidus*, female, the ampulla and the constriction proximally from it are apparent, both branches are approximately the same length, they direct to the sides, the duct is relatively long, the loop covers a third of the distance between the funnel and the spinneret (marked by an arrow); I, *Titanoeca quadriguttata*, female, initially both branches direct to the front and then the side one turns backwards, the side one is longer than the axial one, apparent is the additional branching. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .

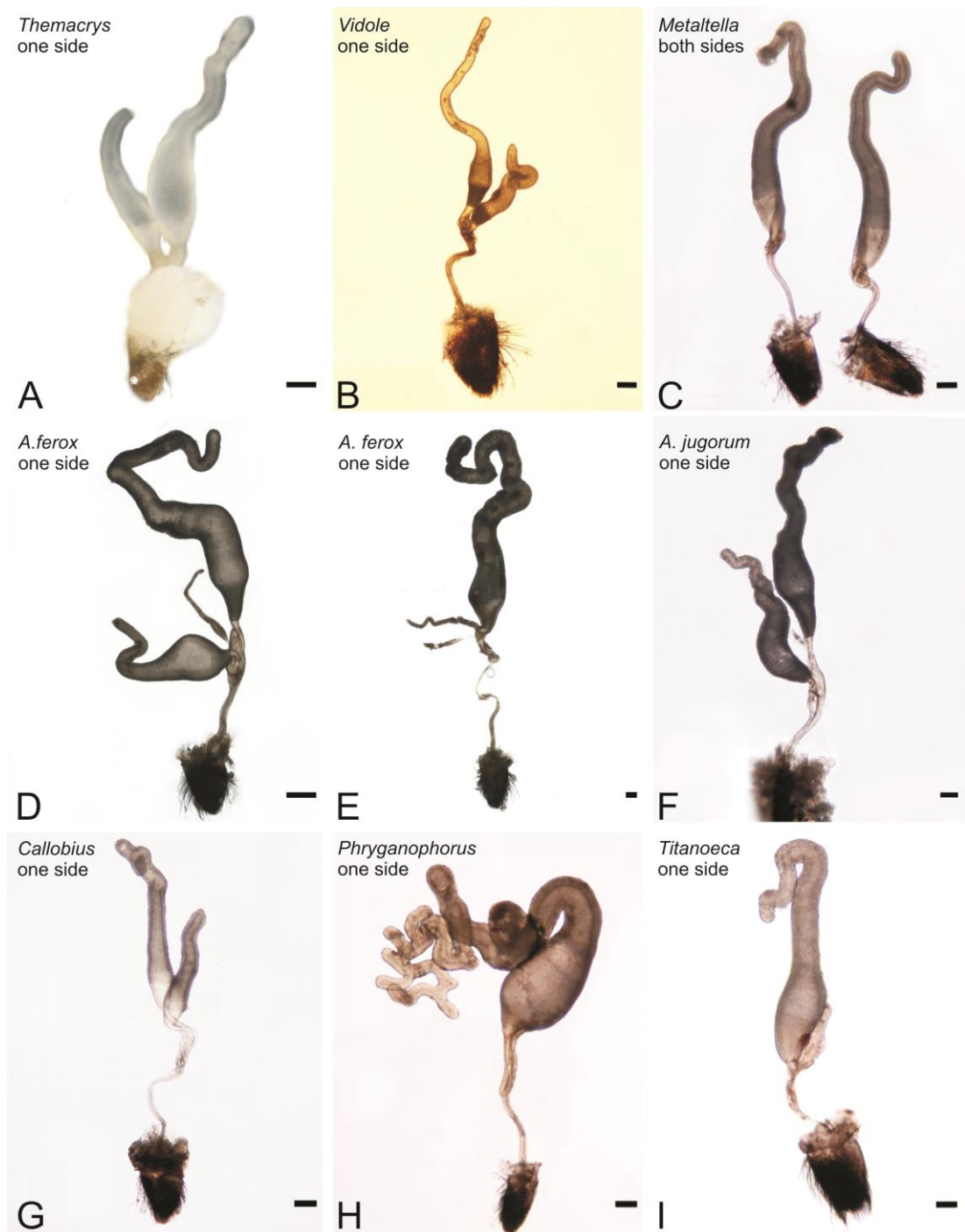


**Fig. 2.** Minor ampullate glands of representatives of Agelenidae spiders. Either „one side“ or „both sides“ of the abdomen, split medially, are depicted. A, *Coelotes terrestris*, female, two glands of almost the same size open on each posterior median spinneret, the ampulla is completely missing, the distal secretory zone is lighter and much shorter than the proximal one; B, *Wadotes calcaratus*, female, one gland from the couple was lost during dissection, the ampulla is completely absent, the distal secretory zone is shorter and lighter than the proximal one; C, *Histoipona torpida*, female, the proximal secretory zone is darker than the distal one; D, *Tegenaria campestris*, male, apparent is the long distal secretory zone and the short proximal zone; E, *Tegenaria silvestris*, female, apparent is the constriction proximally from the ampulla, the proximal secretory zone is darker than the distal one,

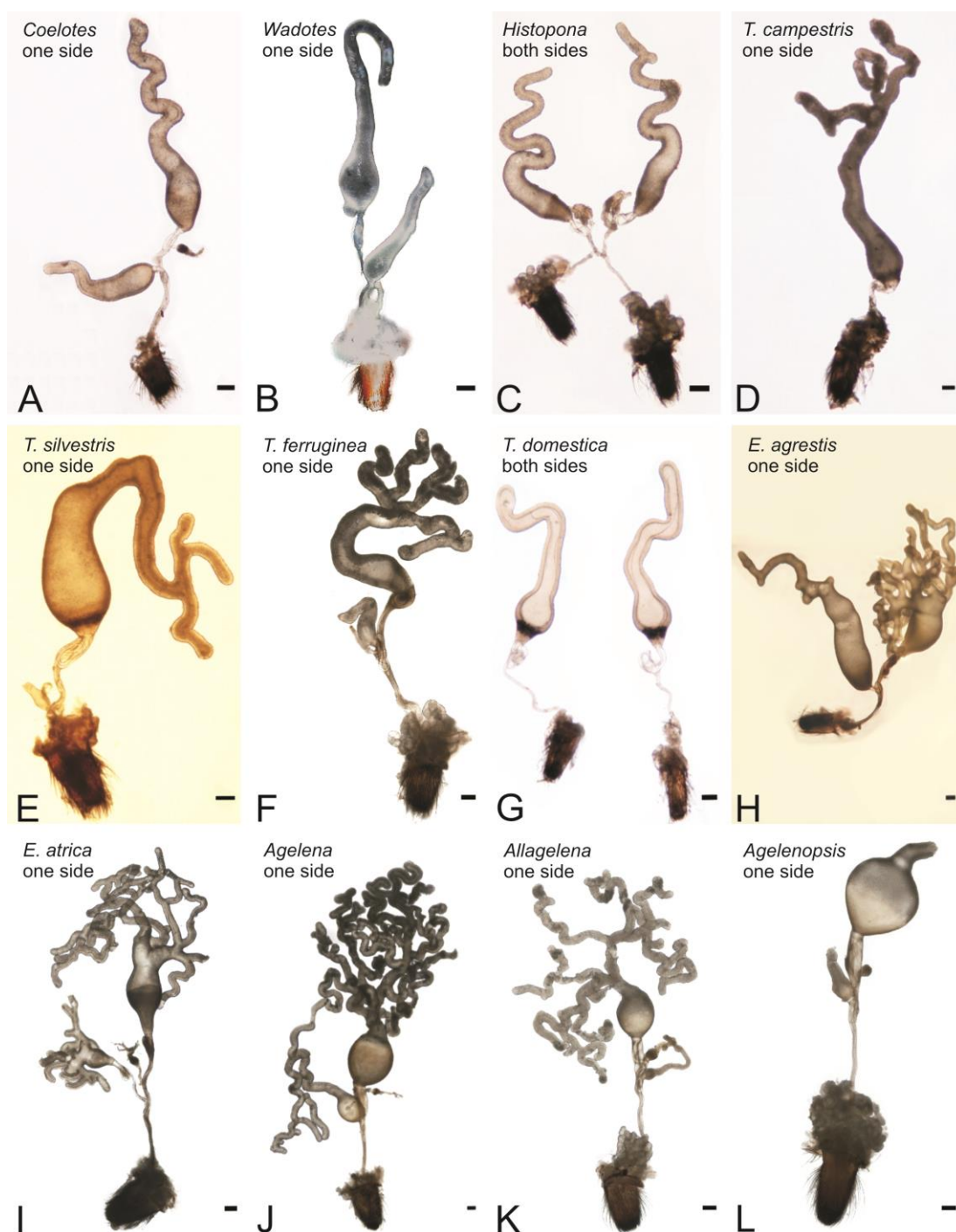
the secretory part is enlarged by elongation; F, *Tegenaria ferruginea*, juvenile female, the secretory part is enlarged by bifurcation; G, *Tegenaria domestica*, female; H, *Eratigena agrestis*, female, the secretory part is enlarged by irregular branching; I, *Eratigena atrica*, female, the secretory part is enlarged by irregular branching, the dwarf gland is marked by an arrow; J, *Agelena labyrinthica*, female; K, *Allagelena gracilens*, female; L, *Agelenopsis pennsylvanica*, female. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** Simple minor ampullate glands of the representatives of the superfamily Amaurobioidea and its outgroups. Either „one side“ or „both sides“ of the abdomen, split medially, are depicted. A, *Seothyra schreineri*, juvenile female, two functional and probably four (the fourth is not visible) accessory glands; B, *Tyrotama australis*, female, the ampulla and the two accessory glands are apparent; C, *Cicurina cicur*, female, the secretory part is not elongated (the tail is missing), the distal secretory zone is darker than the proximal one; D, *Dictyna uncinata*, female, the secretory part is not elongated (the tail is missing), the duct is relatively long, the loop covers one third of the distance between the funnel and the spinneret; E, *Argyroneta aquatica*, subadult male. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4.** Major ampullate glands of the cribellate representatives of the superfamily Amaurobioidea. Either „one side“ or „both sides“ of the abdomen, split medially, are depicted. A, *Themacrys silvicola*, female; B, *Vidole sothoana*, female; C, *Metaltella simoni*, female; D, *Amaurobius ferox*, female; E, *Amaurobius ferox*, male; F, *Amaurobius jugorum*, female; G, *Callobius bennetti*, female; H, *Phryganophorus candidus*, female, the secretory part is enlarged by irregular branching; I, *Titanoeca quadriguttata*, female. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 5.** Major ampullate glands of the representatives of Agelenidae spiders. Either „one side“ or „both sides“ of the abdomen, split medially, are depicted. A, *Coelotes terrestris*, female; B, *Wadotes calcaratus*, female; C, *Histopona torpida*, female; D, *Tegenaria campestris*, male; E, *Tegenaria silvestris*, female; F, *Tegenaria ferruginea*, juvenile female; G, *Tegenaria domestica*, female; H, *Eratigena agrestis*, female; I, *Eratigena atrica*, female; J, *Agelena labyrinthica*, female; K, *Allagelena gracilens*, female; L, *Agelenopsis pennsylvanica*, female, the distal (unbranched) part of the secretory zone is broken. In D–F and H–K, the secretory part is enlarged by irregular branching. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 6.** Major ampullate glands of the representatives of the superfamily Amaurobioidea and its outgroups. Only „one side“ of the abdomen, split medially, is depicted. A, *Seothyra schreineri*, juvenile female; B, *Tyrotama australis*, female; C, *Cicurina cicur*, female; D, *Argyroneta aquatica*, subadult male; E, *Dictyna arundinacea*, female F, *Cybaeus angustiarum*, female; G, *Psammorygma* sp., female; H, *Antistea elegans*, female; I, *Cryphoea silvicola*, male. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .

## **C     **Hunting with sticky tape: Functional shift in silk glands of araneophagous ground spiders (Gnaphosidae)****

**Jonas O. WOLFF, Milan ŘEZÁČ, Tomáš KREJČÍ & Stanislav N. GORB**

**Journal of Experimental Biology 220(12): 2250–2259**

**Abstract.** Foraging is one of the main evolutionary driving forces shaping the phenotype of organisms. In predators, a significant, though understudied, cost of foraging is the risk of being injured by struggling prey. Hunting spiders that feed on dangerous prey like ants or other spiders are an extreme example of dangerous feeding, risking their own death over a meal. Here we describe an intriguing example of the use of attachment silk (piriform silk) for prey immobilization that comes with the costs of reduced silk anchorage function, increased piriform silk production, and additional modifications of the extrusion structures (spigots) to prevent their clogging. We show that the piriform silk of gnaphosids is very stretchy and tough, which is an outstanding feat for a functional glue. This is gained by the combination of an elastic central fibre and a bi-layered glue coat consisting of aligned nanofibrils. This represents the first tensile test data on the ubiquitous piriform gland silk, adding an important puzzle piece to the mechanical catalogue of silken products in spiders.

**Keywords:** Spider silk, piriform silk, adhesion, prey capture, tensile test, spinneret, araneophagy

### **C.1. Introduction**

Severe injury by prey is a high cost of predatory foraging, and the danger imposed by prey may affect a predator's choices considerably (Mukherjee and Heithaus, 2013). Counter intuitively, some predators do not avoid, but specialize on risky prey, and although different hypotheses have been raised to explain the evolution of such specializations, it remains an enigma (Pekár and Toft, 2015). Ground spiders (Gnaphosidae) are free hunting spiders, some of which are very abundant in harsh arid environments. With currently 2,200 described species in 125 genera and a worldwide distribution from sub-arctic to tropical regions they are one of the major spider families (World Spider Catalog, 2016). Many gnaphosids have been reported to prey on ants or spiders (Bristowe, 1958; Grimm, 1985; Jäger, 2002; Jarman and Jackson, 1986; Pekár et al., 2012), but the degree of specialization is unknown. Gnaphosids exhibit some distinct characters, which are presumably adaptations towards a specialization of hazardous prey. The most conspicuous characteristic is a strong modification of the spinning apparatus. Among araneomorph spiders the first pair of spinnerets (ALS, anterior lateral spinnerets) usually bears the openings of single large major ampullate (MA) glands and numerous tiny piriform (PI) glands (Eberhard, 2010). The MA silk produces the main structural thread, the dragline, and from the PI glands short glue-coated micro-fibres emerge that fasten the dragline to substrates (Apstein, 1889; Wolff et al., 2015). This configuration is extremely conserved among araneomorph spiders, presumably because it is the basis for a versatile application of silk (Coddington, 1989; Coddington and Levi, 1991; Eberhard, 2010; Murphy and Roberts, 2015). However, in the Gnaphosidae, this configuration is strongly derived.

The gnaphosid PI glands and their nozzle-like openings, the spigots, are enormously enlarged and retractable, whereas the MA gland is comparably small (Kovoor, 1987; Murphy, 2007; Platnick, 1990). This was related to the following special technique to subdue hazardous prey (i.e. other spiders or ants). The spider quickly runs past the prey, thereby leaving a band of sticky silk behind, which immobilizes the prey's legs (Bristowe, 1958; Grimm, 1985). This mechanism, however, has never been studied in detail, due to the lack of suitable techniques. Furthermore, it is unclear, how the morphological derivations of the ALS to suit a prey capture function affect the original function, namely the spinning of silk anchorages (attachment discs). Is prey

capture a functional substitution or extension, and are there trade-offs between both functions? Generally, silk anchorages with attachment discs should be much more robust against pull-offs than a thread's own glue coat, because the attachment disc structure generates a much higher contact area and effectively controls the peel-off angle (Pugno et al., 2013; Sahni et al., 2012; Wolff, in press; Wolff and Herberstein, 2017). Nonetheless, an enormous mechanical impact is expected in case of a struggling prey attached to a substrate by glue-coated silk. To understand the efficacy and significance of this predatory technique it is therefore of high importance to know the tensile properties of the swathing silk. Furthermore, the mechanism and functional role of the infolding mechanism of the PI spigots was unclear.

We approach these questions by a multi-methodological approach, including (1) behavioural observations using high speed videography to reveal the use of silk during predatory attacks, (2) morphological investigations of the ALS (in the active and inactive state) and their glands using light microscopy, Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) and micro-computed tomography ( $\mu$ CT), to reveal the modification of glands and the biomechanics of the spigots, (3) micro-tensile tests and fracture analysis of isolated PI silk fibres to reveal the mechanical properties of the sticky swathing silk.

## **C.2. Methods**

### *Collection of spiders and silk samples*

Gnaphosid spiders were collected by turning stones, peeling bark and sifting litter. If spiders were found resting inside a silken webbing, its structure was photo documented. A list of studied material is provided in Tab. 1. Spiders were kept in plastic containers with paper tissue that was slightly moistened once a week. Alpine species were kept at 15°C, all other species were kept at room temperature. Glass slides were laid into the containers and removed after some days, in order to collect silk samples. Silk samples were studied with dissecting microscopes.

### *Gland preparation and light microscopy*

The spinning glands of freshly killed spiders were dissected in embryo dishes using physiological solution (0.9% aqueous solution of sodium chloride) and viewed under an Olympus SZX12 stereomicroscope. They were subsequently transferred in a drop

of physiological solution onto a microscope glass slide with a small prefabricated circular dimple and photographed under a Nikon Eclipse 80i light microscope.

#### *Scanning electron microscopy (SEM)*

*Conventional SEM:* Air-dried silk samples were sputter coated with 5 nm Au-Pd and viewed in the S4800 scanning electron microscope (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 3.0 kV.

*Cryo-SEM:* A juvenile *Drassodes* cf. *heeri* was attached to a sample holder using Tissue-Tek<sup>®</sup> compound, and then shock frozen in liquid nitrogen. The frozen specimen was directly sputtered with 10 nm Au-Pd using the Gatan ALTO-2500 cryo system (Gatan Inc., Abingdon, UK) and viewed in the S4800 SEM equipped with the stage cooled down to -120°C.

#### *Microcomputed tomography ( $\mu$ CT)*

A female individual of *Scotophaeus scutulatus* was fixed in 70% ethanol, dehydrated in a series of increasing ethanol concentrations and then critical-point dried. Dried samples were glued onto plastic pipette tips with cyanacrylate glue and scanned with a SkyScan 1172 HR micro-computer tomograph (Bruker microCT, Kontich, Belgium) with an acceleration voltage of 40 kV and a voxel size of 0.5  $\mu$ m. 3D images were reconstructed using NRecon 1.6.6 software and processed with AMIRA 6.0.0.

#### *High speed videography*

Prior prey capture trials, spiders were starved for 1–2 weeks. To investigate the use of silk during prey capture, we placed a gnaphosid and a prey animal into a cylindrical plastic container (diameter 4 cm, height 12 cm). The bottom of the container was removed and replaced by a clear glass slide. The glass slide was sitting in a custom-built 3D-printed frame, which contained lateral tunnels, in which the lenses of a gooseneck lamp were inserted. This induced frustrated reflection in all strands of silks contacting the glass surface (see (Kleinteich and Gorb, 2015) for details). Additional lighting was applied from below the glass slide. As prey items we used other spiders (*Eratigena atrica*, *Amaurobius fenestralis*, *Zygiella x-notata*), collected on the campus of Kiel University, and crickets (*Acheta domesticus*), obtained from a pet shop. Videos were recorded from below, using a Photron

Fastcam SA 1.1 (Photron Inc., San Diego, CA, USA) with 250 or 500 frames per second.

We obtained high speed video recordings of *Drassodex* cf. *heeri* capturing *Eratigena atrica* (N=3) and *Amaurobius fenestralis* spiders (N=5); of *Scotophaeus scutulatus* capturing *E. atrica* (N=2), *Zygiella x-notata* (N=1) and a cricket (*Acheta domesticus*, N=1); and *Zelotes* sp. capturing *E. atrica* (N=1). Additionally we observed *S. scutulatus* capturing an *A. fenestralis* (N=1); and *Gnaphosa* sp. capturing a cricket (N=1). All prey spiders and crickets were of equal or larger size than the gnaphosid, except for *Z. x-notata*, which was approximately 1/3 of the gnaphosid body size. One additional video was captured on a reflection interference contrast microscope (RICM) to investigate the extrusion and application of the PI silk and the change in its optical properties shortly after extrusion. Since the RICM was an inverted microscope, the setup was basically similar, and the image was directed onto the camera chip via a beam splitter. After prey capture trials, glass slides with silk on them were stored and further studied by means of light microscopy.

#### *Micro tensile tests*

To obtain single PI fibres for tensile testing, starved gnaphosids were placed into a Petri dish with a polymer film (ACLAR®-foil, Plano GmbH, Wetzlar, Germany) as a ground substrate and a prey spider (*Eratigena atrica*). After the attack, often trails of parallel PI fibres were found on the plastic substrate. The adhesion of the PI glue to the polymer film was so low, that fibres could be carefully peeled off without damaging stress. For this purpose 0.3–2.0 mm long pieces of PI silk trails were cut at both ends with a razor blade. One end of the PI silk fibre was glued to the tip of a minute insect pin with a tiny amount of cyanoacrylate glue and then carefully detached from the substrate. The pin with the attached silk fibre was then attached to a three-axis micromanipulator (F-131.3SS, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany), and the free end of the fibre was glued onto another pin that was attached to a force transducer (FORT-10, 10g capacity; World Precision Instruments, Inc., FL, USA). The thread was positioned such that it was pulled perpendicular from the force transducer at a constant rate of 50  $\mu\text{m/s}$ , which represents a quasistatic measurement. Forces were recorded with a Biopac data acquisition system (MP-100, Biopac Systems Ltd, Goleta, CA, USA). Tensile tests were recorded with the Photron Fastcam video camera using a frame rate of 50

frames per second and a shutter speed of 0.002 s, and equipped with  $\times 5$ – $\times 10$  macro lenses.

Stress-strain curves were calculated from the force-time curves after Blackledge and Hayashi (2006). First, the curves were smoothed (averaging of each 25 data points, which corresponds to the frequency of the static noise of the transducer), to reduce the inherent noise of the data signal. True stress was calculated from the tensile forces divided by the cross-sectional area of the fibre. The initial fibre diameter was determined from SEM images of untested pieces of the same fibres. The cross-sectional area of the fibre was modelled assuming constant volume throughout the test and simplifying the geometry of the fibre as a half cylinder. This cross-sectional shape was found in the scanning electron microscopy observation of fracture faces of failed piriform threads. We thereby neglected the thin lateral extensions of the glue coat, since these do not significantly contribute to the thread volume. True strain was calculated as the natural logarithm of the actual length divided by the initial length, whereby the actual length was the initial length plus the test time multiplied by the strain rate. Because the deformation of the thread could potentially be non-linear, we additionally exemplarily determined the strain from the video recordings at chosen time points and compared this with the calculated values. No clear difference was found here.

From stress-strain curves certain mechanical parameters were determined, namely extensibility (true strain at breakage), tensile strength (stress at breakage), yield strength (stress at the transition between elastic and plastic deformation as seen as a clear change in slope), toughness (integral of the stress-strain curve until breakage), and Young's modulus (initial slope).

In total, 17 PI silk fibres of *Drassodex* and 2 PI silk fibres of *Scotophaeus* were tested. Some test data had to be omitted, because they did not contain single, but paired fibres. The fibres of *Scotophaeus* were not included into the statistics, because of the small sample size.

### C.3. Results

#### *Silk utilization and prey capture behaviour*

*Prey capture.* In more than half of the observed cases, silk was extruded during attacks and applied both to the substrate and the prey's legs and mouth parts (Fig. 1 F–L). Only PI silk was involved in such attacks. Prior to the silk extrusion, a protrusion and spreading of the spinnerets and inflation of the ALS apex was observed, leading to a wide spreading of PI spigots. However, there were cases, in which no silk was extruded, and the prey was directly grabbed with the front legs and then overwhelmed with a full leg basket (Fig. 1 O–Q). This occurred three times in *D. cf. heeri* capturing *A. fenestralis* of equal size, in *S. scutulatus* capturing a smaller *Z. x-notata* and a cricket of equal size, and *Zelotes* sp. capturing *E. atrica* of equal size. From our anecdotal observations it is unclear, which cues trigger either the use of silk or a direct attack. However, most spiders first tried a direct attack but quickly extruded silk, if the prey turned out to be too large, after the first physical contact (e.g. Fig. 1 A–E). In case of large prey items, the gnaphosid started several swathing attacks and rested still in between. The prey was then often already entangled so that it was significantly hampered in its movements.

The prey spiders often tried to defend by biting. Whereas *E. atrica* was never successful in defence, *A. fenestralis* frequently succeeded in biting the predator (all of observed cases), which led to a fatality in at least one case.

Silk left behind after the attacks included irregular puddles of solidified silk material (presumably resulting from an uncontrolled flow in the beginning of silk emergence) (Fig. 2 S), parallel PI silk trails on the substrate with a tape-like morphology (Fig. 2 K, O–P), and suspended PI threads with a cylindrical glue coat. We frequently observed plumose setae attached to the glue (Fig. 2 U), which presumably originated from the spider prey. The PI silk exhibits a distinct core-coat structure that is well discernible in a dissecting microscope (Fig. 2 Q–R). In *Drassodex cf. heeri* the central fibre has a diameter of  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  (N=14), and the glue strip may spread to a width of 8–15  $\mu\text{m}$ , depending on the wettability of the substrate. In the rapidly extruded PI threads, the width of the glue stripe may vary, and the central fibre may sometimes appear bloated, but in the parallel trails, the structure is usually very regular. With means of reflection interference microscopy we recorded the



emergence and application of the PI silk onto a glass slide during a predatory attack (Fig. 2 L). This revealed that the core-coat structure is already present at emergence, and that the glue coat completely cures within less than one second, as indicated by a change in translucence (Fig. 2 M–N).

*Silk shelters.* Gnaphosids produce silken shelters, in which they hide during periods of inactivity (usually day time) and egg sac guarding (Fig. 2 A–C). The shelters consist of a meshwork of different thread types, including very fine fibres with sub-micron diameter and thicker ones (Fig. 2 D, G). In contrast to comparable shelters in Clubionidae and Salticidae, the threads are not anchored to substrates by attachment discs. However, occasionally short irregularly curved trails of PI silk are applied onto the loose meshwork to hold it in place on the substrate (Fig. 2 D–H). Whereas in *Scotophaeus* and *Drassodex* only few of such glue points were found, their use was more frequent in the webbings of *Hemicloea*. Overall, the silk shelters can be easily removed from smooth surfaces without major damaging. Considerable adhesion of the gnaphosid webbing is observed on rough substrate surfaces, such as rocks and tree bark, indicating that the fibres are attached by mechanical interlocking. Silk is also extensively applied in egg sacs, which we did not analyse here in detail.

*Draglines.* Of all studied species, occasional draglines and abseiling behaviour were only observed in *Arboricaria sociabilis*. *A. sociabilis* are very small gnaphosids, which do not exhibit such a high degree in PI spigot enlargement, and hence no widened PI silk trails. Still, the attachment discs used to fasten the draglines to the substrate (glass slide) exhibit an irregular shape like in the silk anchorages of silk shelters in other gnaphosid species (see above) (Fig. 2 I).

#### *Functional morphology of spinnerets*

In the Cryo-SEM study of a juvenile *Drassodex* cf. *heeri* we observed both the activated and the deactivated state of the ALS. In the deactivated state, the PI spigots are folded inwards and not visible from outside (Fig. 3 A). However, the single MA spigot is situated on a separate part of the ALS apex that is not retracted, and thus durably erected (Fig. 3 E). With the help of  $\mu$ CT the position of the PI spigots in the resting position in the ALS of *Scotophaeus scutulatus* was visualized. The basal ALS apex is invaginated in this state, such that the conical PI spigots are clustered and situated in a horizontal position (Fig. 3 D–F).

In the activated state, the ALS apex is inflated, causing the PI spigots being erected and widely spread (Fig. 3 B–C). The PI spigots are approximately 40  $\mu\text{m}$  wide at the base and 8–10  $\mu\text{m}$  wide at the tip, which is very large for a silk spigot in spiders. The cuticle appears rather thin and flexible at the tip, which leads to the opening being expanded under high pressure (when silk emerges) and collapsing under low pressure (in the resting state). This passively opens and closes the spigot opening, which presumably prevents uncontrolled silk loss and glue curing in the duct.

#### *Gland morphology*

Two types of spinning glands open on the ALS of studied gnaphosids, the piriform (PI) and the major ampullate (MA) glands (Fig. 3 G–J).

*PI glands* (Fig. 3 I). We found a set of usually less than ten large piriform glands and the same number of reduced ones that were active in the previous instar (corresponding number of tartipores is visible next to well-developed spigots, towards the middle of the spinneret). The PI glands are large and whitish, they possess long cylindrical ampulla with a narrow proximal part, composed of the secretory zone B and a tiny tail composed of less translucent secretory zone A. The proximal and distal secretory zones are not clearly separated, but two products can be distinguished inside the lumen of the gland based on their different colour and/or transparency. The piriform glands occur in one cluster, including the long, relatively wide ducts that constitute an opened loop.

*MA glands* (Fig. 3 J). The MA glands produce liquid crystalline material (the content of the gland lumen keeps its shape even when it is taken out, the material behaves like paste). Three pairs of the major ampullate glands can be seen, the large functional primary one (the only functional one, sensu Townley et al. (1993)), the smaller secondary open one (the one that was functional during the last moulting) and the dwarf secondary blocked one (the one that was functional during the moulting before the last one) (e.g. Fig. 3 G).

The secretory part is tubuliform, its distal part is curled. The secretory zones are not apparent (perhaps there is only one); both are transparent to white and of the same width. They just seem to slightly differ in their translucence. The duct is relatively short. It possesses an opened loop in its distal third.

The ALS silk gland system of the representatives of the clade Gnaphosinae (*Gnaphosa* and *Zelotes*) differs from that of phylogenetically more basal *Drassodes* by reduction of the MA glands on one hand and further enlargement of PI glands on the other hand (Fig. 3 H).

*Tensile properties of giant piriform silk*

Of 11 useful tensile test replicates of PI fibres of *Drassodes*, we obtained the following mechanical properties (mean  $\pm$  standard deviation): extensibility =  $0.51 \pm 0.26$  mm/mm; true strength =  $511.0 \pm 123.6$  MPa; yield strength = 250–350 MPa; toughness =  $140.7 \pm 74.3$  MPa; Young's Modulus =  $5.59 \pm 1.75$  GPa. The loading curve exhibits a shape that is characteristic for silks, with an initially high slope during plastic deformation, followed by a drop of the force increase and an extensive section of plastic deformation (Fig. 4 G).

During tensile tests, we observed the occurrence of cracks in the glue coat after exceeding the yield point (at 5–10% extension) (Fig. 4 B–C). A study of the fractured PI silk in the SEM revealed that in these cracks only the outermost skin layer of the glue coat was ruptured, which is a thin homogeneous film (Fig. 4 E, H). Underneath, aligned nano-fibrils were apparent, which form the bulk of the glue material (Fig. 4 H). At cracks in the surface layer, especially at the underside of the thread, we often observed crystals (Fig. 4 E, H, J, K), which may indicate salt-like substances that are embedded in the glue in the native state. Apparently, cracks in the glue coat were only present in the lateral extensions of the glue strip, but were evenly scattered above and next to the embedded central PI fibre (Fig. 4 E, F). Fractured threads always curled towards the upper side (Fig. 4 I), indicating an elastic behaviour of the embedded fibre. Transverse fracture faces exhibited smooth breaking edges of the glue coat and irregular, fibre-like fractures of the central thread (Fig. K, L). However, in longitudinal fractures the core fibre showed a comparably smooth fracture face (Fig. 4 J, K). This may indicate that the central core fibre is a highly anisotropic material. The central fibre was often pulled out of the glue coat at the breaking edge.

#### C.4. Discussion

##### *Consequences of the functional shift*

We showed that gnaphosids are bold predators that are able to subdue prey that are extraordinary large and hazardous. All tested species attacked other spiders and preyed on them. An accessibility of a wide prey spectrum may explain, why gnaphosids are especially successful in barren habitats with low arthropod abundance. Araneophagy is also known from related families, such as Lamponidae (Platnick, 2000) and Cithaeronidae (Edwards and Stiles, 2011), which, however, do not exhibit a modified spinning apparatus. This may indicate that araneophagy evolved earlier than the ALS modification. Of all families within the Gnaphosoidea and allies, the Gnaphosidae are the most diverse and widespread family, which may speak for their great ecological success, that may be linked to their novel use of piriform silk.

The use of sticky silk is an efficient strategy to immobilize the prey before handling it, in order to reduce the risk of injury. Thus the modification of the spinning apparatus might be an adaptation to handle hazardous prey. However, this special adaptation comes with the cost that gnaphosids (except for *Micaria*) cannot spin functional draglines any more, and the function of attachment discs is extremely reduced. The ability to attach threads to substrates via attachment discs (Fig. 2 J) is regarded as one of the key innovations of araneomorph spiders that presumably highly enhanced the versatility of silk use and made the building of webs in a 3D-space possible (Coddington and Levi, 1991). Draglines play a role to secure the spider against unpredicted falls (Ortlepp and Gosline, 2008), to control jumps (Chen et al., 2013) and on-water locomotion (Gorb and Barth, 1994), to navigate in webs (Barth et al., 1998), as elemental structures for webs (Denny, 1976), as egg sac suspension (Gheysens et al., 2005), for shelter building, and for intra- and interspecific communication (Leonard and Morse, 2006; Tietjen, 1977). Hence, a deviation from the usual ALS configuration (single large MA and an array of multiple small PI spigots) is extremely rare among araneomorph spiders (Coddington, 1989; Coddington and Levi, 1991; Eberhard, 2010; Murphy and Roberts, 2015). Although many (but not all) gnaphosids are living at the ground and do not build webs, the reduced functionality of attachment discs may represent a significant draw-back, especially for the security of locomotion through a structured

terrain, and the stability of shelters and egg sacs, all of which may potentially increase the vulnerability towards predation. For instance, we observed that the silk shelters of gnaphosids are easily removable from smooth surfaces and relatively easily teared open. In contrast, silken shelters of Clubionidae and Salticidae adhere strongly to smooth glass surfaces and are destroyed, when attempting to pull them apart under the application of high forces.

Furthermore, silk use for prey capture is costly. Accordingly, in our prey capture trials the spiders did not always make use of their silk. We presume that the spiders start swathing after an assessment of the prey's strength and dangerousness, because it was never started without a previous physical contact with the prey. For direct attacks the dense hairy adhesive pads (scopulae) in the front legs help the spider to get hold onto the prey's body and subdue it (Eggs et al., 2015; Grimm, 1985; Wolff and Gorb, 2012; Wolff et al., 2013) (Fig. 1 R). The fact that spiders precisely budget secretions that are potentially metabolically costly is also known for venom, which amount is adjusted to the type of prey (Boevé, 1994).

The use of sticky silk for prey immobilization is well-known from various web-building spiders, such as orb-web spiders (Araneidae) and cobweb-spiders (Theridiidae) (Foelix, 1982). However, these have evolved an additional set of glands, the aggregate glands, which produce viscid glue, and the ALS are not modified (Coddington, 1989; Peters, 1987; Sahni et al., 2010; Sahni et al., 2011). However, in daddy-longleg spiders (Pholcidae) the piriform glands have diversified, including a highly enlarged gland and spigot (Huber, 2000; Kovoov, 1987). This modification may be related to special wrapping attacks, too (Huber and Fleckenstein, 2008; Jackson and Brassington, 1987). Despite the modifications in the ALS spigots pholcids retain the ability to spin attachment discs, however, with a modified shape. Pholcids rarely spin draglines during locomotion (pers. observation), but it is unclear, if this is due to an inefficiency in dragline attachment or because the glue material must fulfil both functions, dragline attachment and prey immobilization, and should therefore not excessively used.

*Set of modifications in the ALS spinning apparatus related to the functional shift*

Both gland types that open on the anterior lateral spinnerets differ morphologically from the situation that can be seen in related spider groups. The MA glands are

usually the largest spinning glands of spiders. However, in Gnaphosidae (especially in the representatives of the clade Gnaphosinae: *Gnaphosa* and *Zelotes*) we found them to be reduced, and smaller than the PI glands. The secretory part is not remarkably elongated and is not widened proximally (structure for storing silk precursor before its usage, called ampulla, is missing). The spinning duct is relatively short. In contrast, the PI glands and their spigots are highly enlarged, if compared to other spiders, especially their proximal zone that produces the glue coat (Kovoor, 1987; Kovoor and Zylberberg, 1980). Accordingly, the PI silk threads are 10–15 times wider as usual (compare with images in (Wolff et al., 2015)). Despite being significantly enlarged, the secretion product of these PI glands show a general appearance, that is similar to the PI silk of other spiders, with a clear core-coat structure and the glue being composed of aligned nano-fibrils and a thin isotropic skin (Wolff et al., 2015).

The enlargement has probably two functions. First, it permits the quick expelling of high amounts of glue, in order to ensure spreading on rather complex surfaces (like the setose cuticle of arthropod prey). Silk trails left behind after a prey capture event often contained plumose setae of the prey. This indicates, that gluing of body parts with such setae is hampered, because of setal discharge. This effect is responsible for the escape of insect prey from sticky webs (Nentwig, 1982), and is also known from springtails that are densely covered in scale-like setae, that reduce the efficiency of glue as a means to capture them (Wolff et al., 2016; Wolff et al., 2014). A thicker glue coat may ensure that the glue not only spreads on the loose superficial, but also the underlying stable surface (Voigt and Gorb, 2010). Second, a correlated increase of the diameter of the PI silk core may enhance its breaking force, to meet the increased demand of mechanical resistance in single PI fibres due to high forces elicited by the struggling prey.

The widened ducts and spigots come with three potential problems. First, the pressure in the duct and nozzle is reduced. In most silks shear forces in the duct and nozzle play an important role to align and elongate the proteins and form the fibre structure (Knight and Vollrath, 1999). To what extend this is relevant in PI silk is unknown. Since both the glue and the core are composed of aligned nano-fibrils it is conceivable that shear forces and/or self-assembling driven by weak intermolecular forces play a role for the formation of such anisotropy. Second, there might be an

increased risk of desiccation of the aqueous silk dope in the spigot, which could lead to clogged nozzles. The flexibility of the spigot openings and their self-closing mechanism at reduced pressure might effectively prevent this. Interestingly, such flexible and self-closing spigots seem also to be present in glue glands of other spiders, like the aggregate glands of orb and cob web spiders (Coddington, 1989), and the enlarged PI spigot of daddy-longleg spiders (Huber, 2000). Third, in such voluminous nozzles it might be difficult to control pressure and silk flow. Silk material might emerge from the openings and contaminate the exterior of the spigots and surrounding structures. We interpret the unique spigot (de-)activation mechanism as an evolutionary consequence to control the silk flow.

#### *Properties of piriform silk*

Our tensile test data represent the first mechanical assessment of piriform silk. Blackledge and Hayashi (2006) have previously assembled mechanical data from tensile tests of most of the silken products of the orb web spider *Argiope argentata*, including major ampullate silk (dragline silk), minor ampullate silk (auxiliary spiral and bridging silk), tubuliform silk (egg sac silk), flagelliform silk (capture spiral silk) and aciniform silk (wrapping silk). The dragline silk is the strongest silk with 0.6–1.2 GPa in different orb web spiders, whereas flagelliform is the stretchiest with an extensibility of 1.2–1.8 (Blackledge and Hayashi, 2006; Denny, 1976; Köhler and Vollrath, 1995). The toughest silk is aciniform silk with a toughness of approximately 240 MPa (Blackledge and Hayashi, 2006). The piriform silk of *Drassodex* is with 0.5 GPa not as strong as dragline silk and the wrapping silk of orb weavers (Fig. 4 G inset). However, it is more extensible than any other silk, except for the capture spiral threads of orb webs, which are three times stretchier, but less strong. In consequence, the PI fibres are as tough as dragline silk of orb web spiders. The PI silk of *Drassodex* is less stiff than most silks, with the exception of flagelliform silk. These results are in line with previous theoretical estimations, which predicted that piriform silk should be rather stretchy, although extensibility and softness were extremely overestimated (Pugno et al., 2011). These properties can be related to random coil structures, caused by regularly spaced proline domains in the piriform spidroin, which were found to enhance flexibility (Chaw et al., 2017; Geurts et al., 2010). The fractographic analysis revealed that after exceeding the yield, cracks occur in the thin isotropic surface layer of the glue coat. Whereas wide

cracks occur in the lateral extensions of the glue strip, they are regularly distributed over the central fibre. This indicates that the fibre exhibits elastomeric properties, which evenly distribute the stress in the superficial glue coat. The glue seems far less elastic, since fractured threads always curled towards the upper side of the fibre, where less glue material is deposited. Furthermore, fracture faces always show an even breaking edge of the glue coat speaking for a highly ordered, crystalline-like structure, whereas the central fibre exhibited irregular breaking edges. This was likewise found in the piriform silk of orb web spiders (Wolff et al., 2015), showing that the overall structure of PI silk has been kept constant in course of the evolutionary transition. The PI glue is composed of aligned nano-fibrils that are apparently pulled along each other during plastic deformation, which might delay crack propagation and makes the glue highly ductile and tough, as it was shown for similar materials (Brown et al., 2012).

For a glue these are outstanding features. In attachment discs of both web building and wandering spiders PI silk breaks before detachment, in cases of surfaces with moderate to high polarity (Grawe et al., 2014; Wolff et al., 2015). This means that the adhesion of the glue coat exceeds its strength in these cases. Assuming that the pull-off stress works only in a small zone near the detachment (peeling edge), as proposed by previous authors (Pugno et al., 2011; Sahni et al., 2012), it would mean that the glue can withstand a shear strength of 400–700 MPa. For comparison, conventional artificial glues reach shear strengths of 0.9–1.7 MPa (Graham et al., 2016). It is unsurprising that the PI silk of *Drassodex* is considerably stretchy, which is likewise the case in the glue coated threads of the capture spiral in orb webs (Blackledge and Hayashi, 2006). In orb webs the capture spiral must absorb the mechanical impact of an insect flying in with high speed (Denny, 1976; Köhler and Vollrath, 1995). The swathing silk of gnaphosids must likewise absorb high mechanical stresses exerted by the struggling prey, because it is preferably applied onto the mobile and strong appendages of the prey. It is anticipated that in thread anchorages the demands are rather similar, because sudden and heavy load may occur when a spider drops and stops its fall with an attached dragline, or in frame threads of webs that must contribute to the shock absorption of the prey impact. Thus, the changes in the spinning apparatus of Gnaphosids are probably rather related to quantitative than qualitative adjustments.



### **C.5. Conclusion**

The functional shift of PI silk use in Gnaphosidae is an intriguing example of a trade-off. We think that it can only have evolved, because of the pre-existing frequent predation on hazardous prey, like spiders or ants. The immobilization of the prey with sticky silk presumably highly reduces the risk of a fatality during foraging, which may have contributed to the ecological success of this spider family. This must have been so beneficial that it outweighed the cost of reduced ability to anchor silk threads. Future behavioural experiments may shed light on the degree of specialization and the balanced use of PI silk in different species of gnaphosids. Our mechanical data on PI silk, further, adds an important puzzle piece to the catalogue of properties of silken products in spiders. Whether the mechanical and chemical properties of PI silk remained constant throughout, the functional shift from thread attachment to prey capture remains to be studied.

### **Acknowledgements**

We thank Arno Grabolle for the identification of *Drassodex* cf. *heeri* and worthy communications on his extensive observations on European Gnaphosidae. We, further, thank Axel Schönhofer for the organization of the collection trip to the Southern Alps. Thanks to Mariella Herberstein for some discussions on araneophagic spiders. Thomas Kleinteich is acknowledged for the development of a 3D-printed glass cover slide frame for observation of frustrated reflection. Fabienne Frost assisted during prey capture experiments.

Jonas Wolff was supported by a doctoral scholarship of the German Merit Foundation (Studienstiftung des Deutschen Volkes) and a Macquarie Research Fellowship of Macquarie University. Milan Řezáč was supported by the Czech Ministry of Agriculture (project MZe RO0415). Tomáš Krejčí was supported by Internal Grant Agency of the Faculty of Environmental Sciences, CULS Prague (project 4211013123183). The  $\mu$ CT was founded by the German Science Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) ( $\mu$ CT Großgeräteantrag) to Stanislav Gorb.

## C.6. Literature cited

- Apstein, C. 1889. Bau und Funktion der Spinnndrüsen der Araneida. Arch. Naturg. 55: 29–74.
- Barth, F., Gorb, S. & Landolfa, M. 1998. Dragline-associated behaviour of the orb web spider *Nephila clavipes* (Araneoidea, Tetragnathidae). Journal of Zoology 244: 323–330.
- Blackledge, T. A. & Hayashi, C. Y. 2006. Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). Journal of Experimental Biology 209: 2452–2461.
- Boevé, J. L. 1994. Injection of venom into an insect prey by the free hunting spider *Cupiennius salei* (Araneae, Ctenidae). Journal of Zoology 234: 165–175.
- Bristowe, W. S. 1958. The world of spiders. London: William Collins & Sons Ltd.
- Brown, C. P., Harnagea, C., Gill, H. S., Price, A. J., Traversa, E., Licoccia, S. & Rosei, F. 2012. Rough fibrils provide a toughening mechanism in biological fibers. Acs Nano 6: 1961–1969.
- Chaw, R. C., Saski, C. A. & Hayashi, C. Y. 2017. Complete gene sequence of spider attachment silk protein (PySp1) reveals novel linker regions and extreme repeat homogenization. Insect biochemistry and molecular biology 81: 80–90.
- Chen, Y.-K., Liao, C.-P., Tsai, F.-Y. & Chi, K.-J. 2013. More than a safety line: jump-stabilizing silk of salticids. Journal of the Royal Society Interface 10, 20130572.
- Coddington, J. A. 1989. Spinneret silk spigot morphology: evidence for the monophyly of orbweaving spiders, Cyrtophorinae (Araneidae), and the group Theridiidae plus Nesticidae. Journal of Arachnology 17: 71–95.
- Coddington, J. A. & Levi, H. W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). Annual review of ecology and systematics 22: 565–592.
- Denny, M. 1976. The physical properties of spider's silk and their role in the design of orb-webs. Journal of Experimental Biology 65: 483–506.
- Eberhard, W. G. 2010. Possible functional significance of spigot placement on the spinnerets of spiders. Journal of Arachnology 38: 407–414.
- Edwards, G. & Stiles, J. T. 2011. The first North American records of the synanthropic spider *Cithaeron praedonius* OP-Cambridge (Araneae:

- Gnaphosoidea: Cithaeronidae), with notes on its biology. *Insecta Mundi* 2011, 1–7.
- Eggs, B., Wolff, J. O., Kuhn-Nentwig, L., Gorb, S. N. & Nentwig, W. 2015. Hunting without a web: how lycosoid spiders subdue their prey. *Ethology* 121: 1166–1177.
- Foelix, R. F. 1982. *Biology of spiders*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- Geurts, P., Zhao, L., Hsia, Y., Gnesa, E., Tang, S., Jeffery, F., La Mattina, C., Franz, A., Larkin, L. & Vierra, C. 2010. Synthetic Spider Silk Fibers Spun from Pyriform Spidroin 2, A Glue Silk Protein Discovered in Orb-Weaving Spider Attachment Discs. *Biomacromolecules* 11: 3495–3503.
- Gheysens, T., Beladjal, L., Gellynck, K., Van Nimmen, E., Van Langenhove, L. & Mertens, J. 2005. Egg sac structure of *Zygiella x-notata* (Arachnida, Araneidae). *Journal of Arachnology* 33: 549–557.
- Gorb, S. N. & Barth, F. G. 1994. Locomotor behavior during prey-capture of a fishing spider, *Dolomedes plantarius* (Araneae: Araneidae): Galloping and stopping. *Journal of Arachnology*, 89–93.
- Graham, L. D., Glattauer, V., Peng, Y. Y., Vaughan, P. R., Werkmeister, J. A., Tyler, M. J. & Ramshaw, J. A. 2016. An adhesive secreted by Australian frogs of the genus *Notaden*. In *Biological adhesives*, pp. 223–243: Springer.
- Grawe, I., Wolff, J. O. & Gorb, S. N. 2014. Composition and substrate-dependent strength of the silken attachment discs in spiders. *J. R. Soc. Interface* 11: 1742–5662.
- Grimm, U. 1985. Die Gnaphosidae Mitteleuropas (Arachnida, Araneae). *Abh. naturwiss. Ver. Hamburg,(NF)* 26: 1–318.
- Huber, B. A. 2000. New World pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): a revision at generic level. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1–347.
- Huber, B. A. & Fleckenstein, N. 2008. Comb-hairs on the fourth tarsi in pholcid spiders (Araneae, Pholcidae). *Journal of Arachnology* 36: 232–240.
- Jackson, R. & Brassington, R. J. 1987. The biology of *Pholcus phalangioides* (Araneae, Pholcidae): predatory versatility, araneophagy and aggressive mimicry. *Journal of Zoology* 211: 227–238.
- Jäger, P. 2002. Über eine bemerkenswerte Verhaltensweise von *Scotophaeus scutulatus* (Araneae: Gnaphosidae). *Arachnol. Mitt.* 24: 72–75.

- Jarman, E. A. & Jackson, R. R. 1986. The biology of *Taieria erebus* (Araneae, Gnaphosidae), an araneophagic spider from New Zealand: silk utilisation and predatory versatility. *New Zealand Journal of Zoology* 13: 521–541.
- Kleinteich, T. & Gorb, S. N. 2015. Frog tongue acts as muscle-powered adhesive tape. *Open Science* 2, 150333.
- Knight, D. & Vollrath, F. 1999. Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266: 519–523.
- Köhler, T. & Vollrath, F. 1995. Thread biomechanics in the two orb-weaving spiders *Araneus diadematus* (Araneae, Araneidae) and *Uloborus walckenaerius* (Araneae, Uloboridae). *Journal of Experimental Zoology* 271: 1–17.
- Kovoor, J. 1987. Comparative structure and histochemistry of silk-producing organs in arachnids. In *Ecophysiology of spiders*, pp. 160–186: Springer.
- Kovoor, J. & Zylberberg, L. 1980. Fine-structural aspects of silk secretion in a spider (*Araneus diadematus*). 1. Elaboration in the pyriform glands. *Tissue & Cell* 12: 547–556.
- Leonard, A. S. & Morse, D. H. 2006. Line-following preferences of male crab spiders, *Misumena vatia*. *Animal Behaviour* 71: 717–724.
- Mukherjee, S. & Heithaus, M. R. 2013. Dangerous prey and daring predators: a review. *Biological Reviews* 88: 550–563.
- Murphy, J. 2007. *Gnaphosid genera of the world*. St Neots, Cambs, UK: British Arachnological Society.
- Murphy, J. A. & Roberts, M. J. 2015. *Spider families of the world and their spinnerets*. York: British Arachnological Society.
- Nentwig, W. 1982. Why do only certain insects escape from a spiders web. *Oecologia* 53: 412–417.
- Ortlepp, C. & Gosline, J. M. 2008. The scaling of safety factor in spider draglines. *Journal of Experimental Biology* 211: 2832–2840.
- Pekár, S., Coddington, J. A. & Blackledge, T. A. 2012. Evolution of stenophagy in spiders (Araneae): evidence based on the comparative analysis of spider diets. *Evolution* 66: 776–806.
- Pekár, S. & Toft, S. 2015. Trophic specialisation in a predatory group: the case of prey-specialised spiders (Araneae). *Biological Reviews* 90: 744–761.

- Peters, H. M. 1987. Fine structure and function of capture threads. In *Ecophysiology of spiders*, pp. 187–202: Springer.
- Platnick, N. I. 1990. Spinneret morphology and the phylogeny of ground spiders (Araneae, Gnaphosoidea). *American Museum Novitates* 2978: 1–42.
- Platnick, N. I. 2000. A relimitation and revision of the Australasian ground spider family Lamponidae (Araneae: Gnaphosoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1–328.
- Pugno, N., Vanzo, J., Cranford, S. & Buehler, M. 2011. Simultaneous material and structural optimization in the spider web attachment disk. In *Atti del XX Cong. Nazionale dell' Associazione Italiana di Meccanica Teorica ed Applicata, Minisymposium "Micro- or nano-mechanics"*, Settembre 12–15, 2011. Bologna, Italy.
- Pugno, N. M., Cranford, S. W. & Buehler, M. J. 2013. Synergetic material and structure optimization yields robust spider web anchorages. *Small* 9: 2747–2756.
- Sahni, V., Blackledge, T. A. & Dhinojwala, A. 2010. Viscoelastic solids explain spider web stickiness. *Nature Communications* 1.
- Sahni, V., Blackledge, T. A. & Dhinojwala, A. 2011. Changes in the adhesive properties of spider aggregate glue during the evolution of cobwebs. *Scientific Reports* 1.
- Sahni, V., Harris, J., Blackledge, T. A. & Dhinojwala, A. 2012. Cobweb-weaving spiders produce different attachment discs for locomotion and prey capture. *Nature Communications* 3.
- Tietjen, W. J. 1977. Dragline-following by male lycosid spiders. *Psyche* 84: 165–178.
- Voigt, D. & Gorb, S. 2010. Egg attachment of the asparagus beetle *Crioceris asparagi* to the crystalline waxy surface of *Asparagus officinalis*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277: 895–903.
- Wolff, J. O. in press. Structural effects of glue application in spiders – What can we learn from silk anchors? In *Bio-inspired structured adhesives*, eds. L. Xue L. Heepe and S. N. Gorb). Dordrecht: Springer Science+Business Media.
- Wolff, J. O. & Gorb, S. N. 2012. Comparative morphology of pretarsal scopulae in eleven spider families. *Arthropod Structure & Development* 41: 419–433.

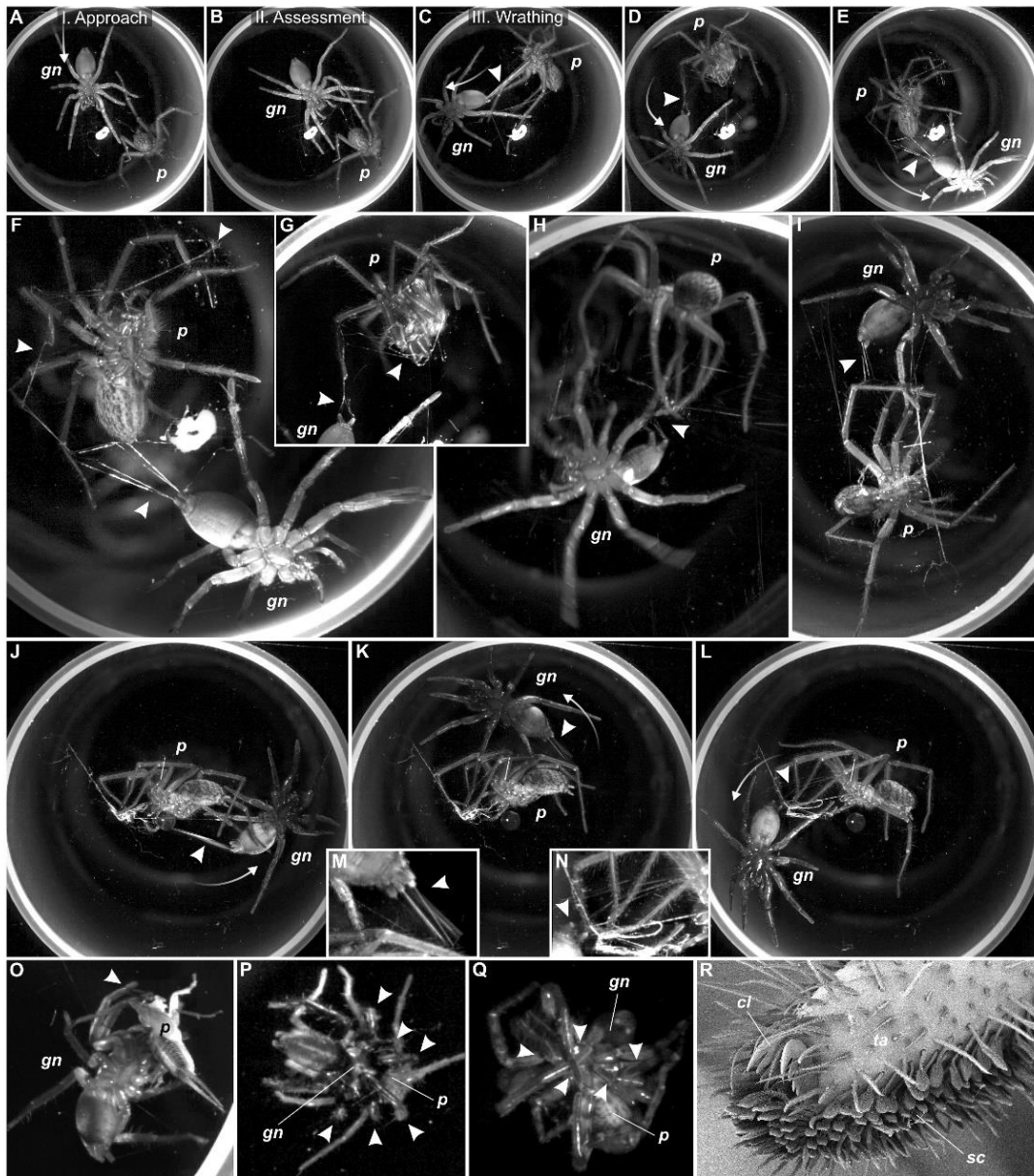
- Wolff, J. O., Grawe, I., Wirth, M., Karstedt, A. & Gorb, S. N. 2015. Spider's superglue: thread anchors are composite adhesives with synergistic hierarchical organization. *Soft Matter* 11: 2394–2403.
- Wolff, J. O. & Herberstein, M. E. 2017. 3D-printing spiders: back-and-forth glue application yields silk anchorages with high pull-off resistance under varying loading situations. *Journal of the Royal Society Interface* 14, 20160783.
- Wolff, J. O., Martens, J., Schönhofer, A. L. & Gorb, S. N. 2016. Evolution of hyperflexible joints in sticky prey capture appendages of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Organisms Diversity & Evolution* 16: 549–557.
- Wolff, J. O., Nentwig, W. & Gorb, S. N. 2013. The great silk alternative: multiple co-evolution of web loss and sticky hairs in spiders. *Plos One* 8, e62682.
- Wolff, J. O., Schönhofer, A. L., Schaber, C. F. & Gorb, S. N. 2014. Gluing the ‘unwetttable’: soil-dwelling harvestmen use viscoelastic fluids for capturing springtails. *The Journal of experimental biology* 217: 3535–3544.
- World Spider Catalog. 2016. World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 17.5.

## C.7. Tables

**Tab. 1.** List of spider material studied. Abbreviations of collections: CRI – Crop Research Institute, Prague; CAU – Functional Morphology and Biomechanics Lab, Zoological Institute, University of Kiel, Kiel; MQ – Behavioural Ecology Lab, Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney

Species	Material	Experiments	Collection site	Voucher
<i>Drassodes cupreus</i> (Blackwall, 1834)	1♂, 1♀	Gland dissection	Czechia: Kramolín, 49.1399, 16.1106	CRI
<i>Drassodes lapidosus</i> (Walckenaer, 1802)	6♂, 6♀, 6 juv.	Gland dissection	Czechia: Prague 5 – Hlubočepy, 50.0431N, 14.3930E; Hluboké Mašůvky, 48.9363, 16.0229	CRI
<i>Drassodex cf. heeri</i> (Pavesi, 1873)	1♂, 3♀, 1 juv.	Silk sampling, HSV, tensile testing	Italy: Lombardi – Bagolino, 45.8494N, 10.3678E; Valle d’Aosta – Cervinia, 45.9557N, 7.6558E	CAU
<i>Gnaphosa lucifuga</i> (Walckenaer, 1802)	2♂, 3♀	Gland dissection	Czechia: Mohelno, 49.1024N, 16.1605E	CRI
<i>Gnaphosa lugubris</i> (C. L. Koch, 1839)	4♂, 4♀, 5 juv.	Gland dissection	Czechia: Prague 5 – Hlubočepy, 50.0431N, 14.3930E; Hluboké Mašůvky, 48.9363, 16.0229	CRI
<i>Gnaphosa</i> sp. Latreille, 1804	1♀	Silk sampling, HSV	Italy: Liguria – San Bernado, 44.0953N, 7.8011E	CAU
<i>Hemicloea</i> sp. Thorell, 1870	1♂, 1♀	Silk sampling	Australia: Sydney – North Ryde, University campus, -33.7707N, 151.1123E	MQ
<i>Arboricaria sociabilis</i> (Kulczyński, 1897)	3 juv.	Silk sampling	Czechia: Nové Mlýny, 48.8456858N, 16.7286386E	CRI
<i>Scotophaeus scutulatus</i> (L. Koch, 1866)	1♀	Gland dissection	Czechia: Kramolín, 49.1399N, 16.1106E	CRI
<i>Scotophaeus scutulatus</i> (L. Koch, 1866)	2♀, 1 juv.	Silk sampling, HSV, µCT, tensile testing	Germany: Kiel – University campus, abandoned zoo, 54.3483N, 10.1161E	CAU
<i>Zelotes latreillei</i> (Simon, 1878)	1♀	Gland dissection	Czechia: Vysočany, 48.9617N, 15.6802E	CRI
<i>Zelotes</i> sp. Gistel, 1848	2♀	Silk sampling, HSV	Italy: Lombardi – Bagolino, 45.8494N, 10.3678E	CAU

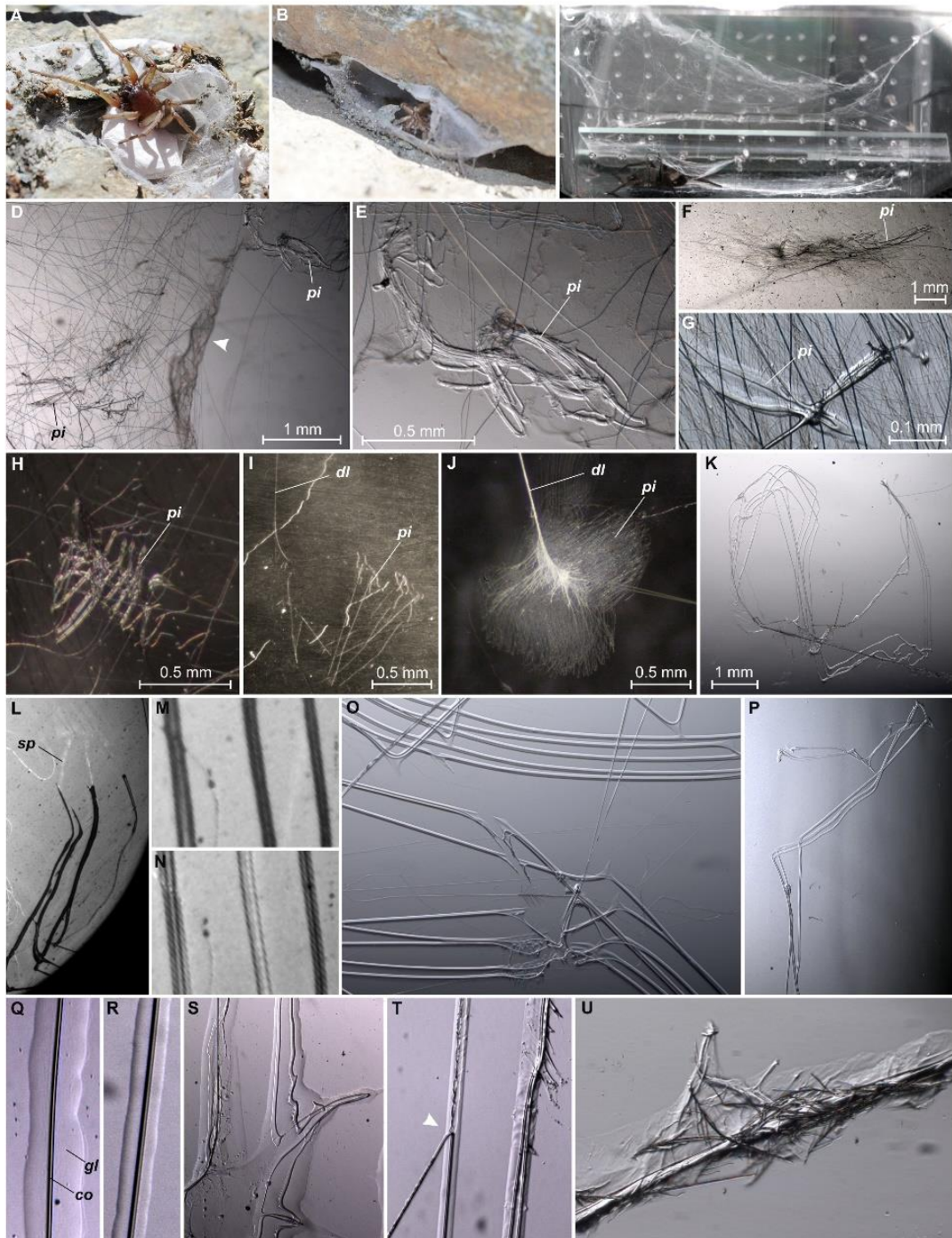
## C.8. Figures



**Fig. 1. Prey capture mechanisms in Gnaphosidae.** All images, except R. show stills of high speed video sequences filmed from below through a glass slide. Abbreviations: cl, pretarsal claws; gn, gnaphosid; p, prey; sc, scopula; ta, tarsus. A–G. Sequence of a female *Drassodex* cf. *heeri* capturing an *Eratigena atrica*. Arrows indicate direction of movement of the gnaphosid, and arrowheads indicate silk discharge. A. The gnaphosid passes the prey spider (approach). B. When it gets in physical contact with the prey, it tries to grab it (assessment). C–G. If the prey turns out to be too strong or agile, the gnaphosid touches the ground to initiate the extrusion of sticky silk, and then runs around the prey, thereby pulling strands of PI silk from its spinnerets. The silk is placed on appendages by directed movements of the opisthosoma. F. Enlarged detail of the swathing attack seen in E. G. Enlarged detail of the swathing attack seen in D. Note the glued chelicerae of the prey (arrowhead). H. Video still of a swathing attack of a male *D.* cf. *heeri* on an *E. atrica*. I–N. Video



stills of a swathing attack of a female *Scotophaeus scutulatus* on *E. atrica*. O. Video still of an attack of a juvenile *S. scutulatus* on a cricket (*Acheta domesticus*), showing direct grabbing with the front legs (arrowhead) and omitted silk use. P. Video still of an attack of *Zelotes* sp. on *E. atrica*, showing direct grabbing with the leg I-III (arrowheads) and omitted silk use. Q. Video still of an attack of *D. cf. heeri* on *Amaurobius fenestralis*, showing direct grabbing with a full leg basket (arrowheads) and omitted silk use. R. Cryo-SEM image of the tip of a front leg of a juvenile *D. cf. heeri*, exhibiting dense hairy adhesive pads (scopulae) that presumably assist in prey retention.

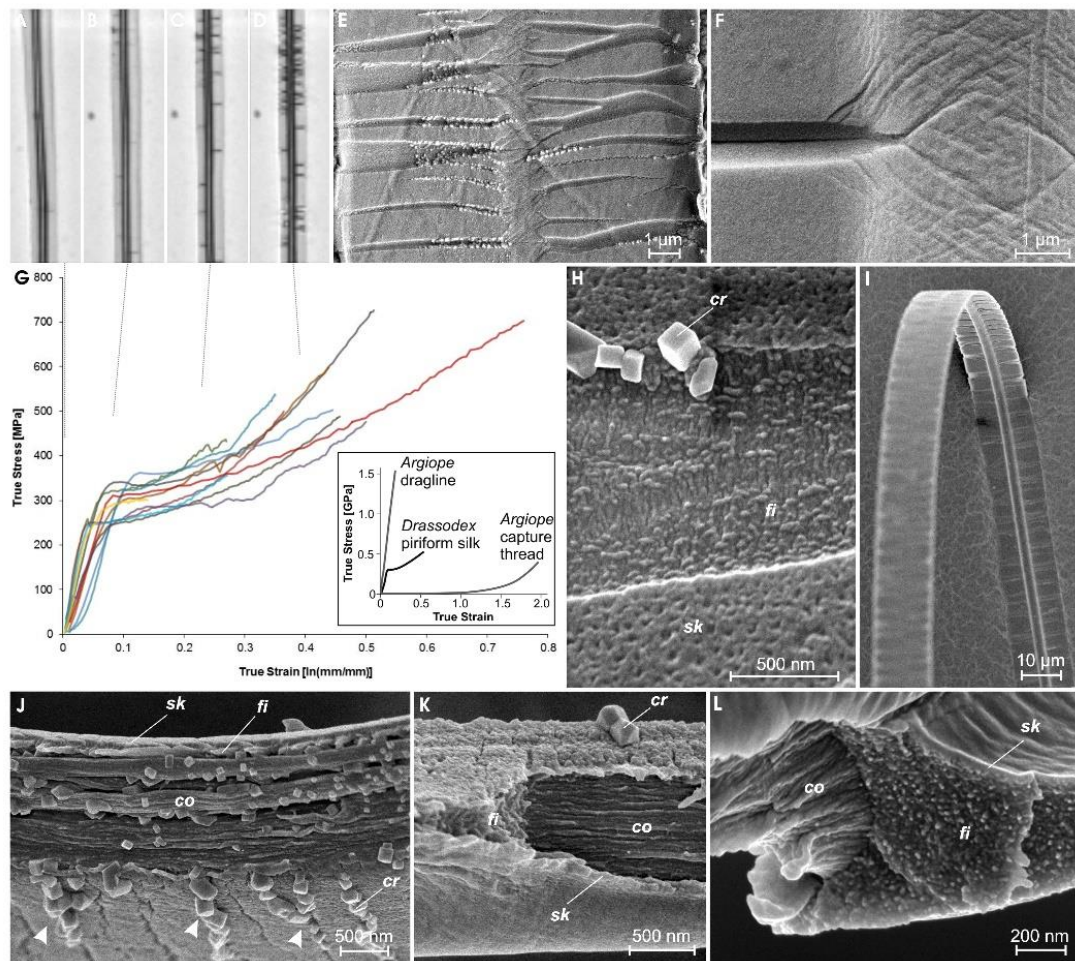


**Fig. 2. Silken products of Gnaphosidae.** Abbreviations: co, core; dl, dragline; gl, glue; pi, piriform gland silk; sp, spigot of the piriform gland. A. Female *Drassodex* cf. *heeri* guarding an egg sac, as found in an opened silk shelter under a flat rock (alpine scree, Cervinia). B. Silken retreat of *D.* cf. *heeri* in a rock crevice. C. Silken shelter and webbing produced by a female *Scotophaeus scutulatus* in captivity. D. Detail of a shelter of *D.* cf. *heeri* spun against a glass slide in captivity. E. Detail of a glue patch seen in D. F. Anchorage of an upper suspension of the shelter of *S. scutulatus* seen in C. G. Detail of the patch of the silk anchorage seen in F. H. PI silk trails in the shelter lining of *Hemicloea* sp. I. Dragline anchorage of a juvenile *Arboricaria sociabilis*. J. Dragline anchorage (attachment disc)

of *Eriophora* sp. (Araneidae) as an example of the usual structure of PI silk products in araneomorph spiders. K. PI silk trails produced by a female *S. scutulatus* during an attack on an *E. atrica*. L. RICM high speed video still of a juvenile *D. cf. heeri* discharging PI silk during an attack against *A. fenestralis*. M–N. Details of the silk trails shortly after and 0.68 sec. after extrusion. Note the change in translucence indicating a change in refraction index (getting more similar to glass), indicating curing of the glue coat. O. Detail of PI silk trails discharged by a *D. cf. heeri* during an attack on *E. atrica*. P. PI silk trails produced by a *Gnaphosa* sp. during an attack on a cricket. Q. Detail of a PI thread discharged by *Gnaphosa* sp. during an attack on a cricket, attached to glass. R. Detail of a PI thread discharged by a female *S. scutulatus* during an attack on an *E. atrica*, attached to glass. S. Detail of PI silk discharged by *Gnaphosa* sp. during an attack on a cricket, with an irregular core-coat structure. T. Detail of a PI thread discharged by *D. cf. heeri* during an attack on an *E. atrica*, with the fibre being partly damaged by the struggling prey. Note that the core fibre is ripped out of the glue coat (arrowhead). U. Detail of a bundle of PI threads discharged by *S. scutulatus* during an attack on an *A. fenestralis*, with the silk being contaminated with plumose setae of the prey.



**Fig. 3. Spinning apparatus of Gnaphosidae.** Abbreviations: als, anterior lateral spinnerets; ma, major ampullate gland (or gland opening); pi, piriform gland (or gland opening). A–C. Cryo-SEM images of the anterior lateral spinnerets (ALS) of a juvenile shock frozen *Drassodex* cf. *heeri*. A. Inactivated (resting) state, with the large PI spigots being hidden in the cylindrical ALS shaft. B–C. Activated state, with the large PI spigots widely spread. D–F. Reconstruction of an inactivated ALS of a female *Scotophaeus scutulatus*, showing the position of the PI spigots in rest, as obtained from  $\mu$ CT. Spigots are coloured in E and F. G. Dissected ALS silk glands of a juvenile *D. lapidosus*. H. Dissected ALS silk glands of a female *Gnaphosa lugubris*. I. Single PI gland of a juvenile *D. lapidosus*. J. Detail of MA glands of a female *G. lugubris*.



**Fig. 4. Mechanical characterization and fractrography of giant PI silk in Gnaphosidae.**

Abbreviations: co, core fibre; cr, crystal; fi, nano-fibrillar interior of the glue coat; sk, skin layer of the glue coat. A–D. Details of an isolated PI silk thread of *Drassodex cf. heeri* during a tensile test, with A at the start of the test, B approximately at the yield point, and D shortly before fracture. Grey dotted lines indicate the respective positions in the plot G. Note the repeated occurrence of cracks in the lateral glue-only extensions of the thread. E. Detail of the appearance of the tested thread, as seen in the SEM. F. Detail of the central part of a tested thread, showing that the crack in the glue skin is effectively stopped at the, putative elastic, central core fibre (right hand). G. Stress-strain plot of 11 tested PI silk threads of *D. cf. heeri* (different color for each sample). Inset shows a mean curve in relationship to orb web spider dragline silk (the strongest type of silk) and capture spiral silk (the most extensible silk), after Blackledge and Hayashi (2006). H. Detail of a crack in the glue, showing the ruptured skin layer and the nano-fibrillar character of the underlying, ductile, glue portion. Also note the formation of crystals at the edge of the crack, which might result from salts leaking out. I. Appearance of the relaxed, ruptured thread, curling towards the upper side. J–L. Details of the fracture faces of ruptured threads. J. Longitudinal fracture of the central fibre. K. Partial longitudinal fracture of the core fibre and the glue coat. L. Transverse fracture.

## 6. Závěr

Nedostatečně prozkoumané morfologické a histologické charakteristiky kopulačních a snovacích orgánů araneomorfních pavouků zasluhují mnohem více pozornosti. Stepníci hrají díky svému fylogeneticky bazálnímu postavení mezi entelegynnými pavouky (Miller et al. 2012) zásadní roli při porozumění evoluci entelegynných pohlavních orgánů. Výzkum snovacích žláz se doposud zaměřoval zejména na velké ampulovité žlázy araneoidních pavouků a ostatní žlázy byly do značné míry přehlíženy. Přitom funkce všech typů snovacích žláz se výrazně promítá do většiny aktivit pavouků (Glatz 1967; Work 1981; Peters 1984; Kovoov 1987; Peters 1987; Peters & Kovoov 1989; Peters 1993; La Mattina 2008; Řezáč et al. 2017; Wolff et al. 2017).

Stepník rudý (*Eresus kollari*) je entelegynný pavouk s typickou stavbou pohlavních orgánů (sensu Uhl 2002). Pro kopulační orgány pavouků čeledi Eresidae je typická tzv. anteriorní výduť, která komunikuje skrze epigynu s vnějším prostředím a z vnitřní strany navazuje na kopulační kanálek vedoucí do spermatéky (Miller et al. 2012; Krejčí et al. 2015).

Krejčí et al. (2015) popsal dva typy pórů asociovaných s různými částmi kopulačních orgánů: (1) na anteriorních výdutích se vyskytující malé množství velkých pórů a (2) na spermatékách se vyskytující velké množství velmi malých pórů. Všechny genitální struktury jsou v různé míře obklopeny vrstvou sekrečního epitelu, jež je nejvíce vyvinut v oblasti kolem laloků spermaték a přední části anteriorních bulbů. Morfologická a histologická stavba sekrečního epitelu asociovaného se samičími kopulačními orgány byla popsána i u dalších druhů pavouků (Cooke 1966; Coyle et al. 1983; Lopez, 1987; Suhm & Alberti 1993; Uhl 1994a,b; Uhl 1996; Uhl 2000; Berendonck & Greven, 2005; Michalik et al. 2005; Useta et al. 2007).

U *E. kollari* je epitel obklopující velké póry na anteriorních bulbech složen z glandulárních jednotek Třidy 3 (Noirot & Quennedey 1974, 1991). Tento epitel je typicky nalézán kolem orgánů skladujících sperma, kde se produkt tohoto epitelu pravděpodobně podílí na zásobování spermatozoa dostatečným množstvím živin (Uhl 1994a,b; Suhm & Alberti 1996; Uhl 2000; Berendonck & Greven 2005; Michalik et al. 2005; Useta et al. 2007). V anteriorních výdutích u *E. kollari* však

sperma nalezeno nebylo (Krejčí et al. 2015) a sekret přilehlého epitelu je tak pravděpodobně využíván k jiné funkci.

První teorií je, že produkcí velkého množství sekretu a jeho rychlým transportem do lumenu anteriorních výdutí skrze velké póry může dojít k transportu spermatu do spermaték, kde je sperma uloženo až do doby fertilizace vajíček.

Druhá teorie se opírá o tvorbu kopulačních zátek. Stepníci rodu *Eresus* (Krejčí et al. 2015) a *Stegodyphus* (Kraus & Kraus 1988) zalepují po kopulaci kopulační otvory v epigyně samice amorfním sekretem, čímž je zabráněno další úspěšné kopulaci. Kopulační zátky obvykle tvoří samci (Braun 1956; Suhm et al. 1996; Knoflach 1998; Knoflach 2004), ale jsou známé případy, kdy se na jejich tvorbě podílí i sama samice (Knoflach 1998, 2004; Eberhard 2004; Aisenberg & Eberhard 2009). Sekret produkovaný sekrečním epitelem kolem anteriorních výdutí u *E. kollari* by mohl mít podobnou funkci a podílet se tak na vzniku kopulačních zátek.

Jak bylo popsáno výše, spermatéky jsou asociované oproti anteriorním výdutím s velkým množstvím malých pórů (Krejčí et al. 2015). Tyto póry jsou opět obklopené silnou vrstvou epitelu. Obvykle je epitel obklopující spermatéky složen z glandulárních jednotek Třídy 3. U šestiočky *Dysdera erythrina* byl však popsán epitel obklopující posteriorní divertikulum, který se skládá z glandulárních jednotek Třídy 1 a epitel obklopující spermatéku složen z glandulárních jednotek Třídy 3. Uhl (2000) předpokládá produkci různých typů sekretu vedoucí k různým skladovacím podmínkám pro spermie. Podobná situace se vyskytuje i u *E. kollari* (Krejčí et al. 2015). Avšak v tomto případě epitel obklopující spermatéky má skladbu odpovídající spíše transportnímu epitelu. Nejsou zde typické sekreční buňky, namísto toho jsou epiteliální buňky charakteristické nápadným basálním labyrintem, které společně formují apikální komplex nesoucí velké množství mikrovily. Transportní epitel zajišťuje především transport iontů a vyskytuje se např. v koxálních žlázách členovců (Rosenberg 1983; Alberti & Coons 1999; Rosenberg et al. 2006). U *E. kollari* může tento sekret ovlivňovat podmínky v lumenu spermaték, ale zároveň již nemusí mít vliv na výživu spermií.

Snovací žlázy se u pavouků vyvinuly v závislosti na jejich použití v několika různých typech (Kovoor & Peters 1988). Nejvíce pozornosti bylo doposud věnováno výzkumu největších snovacích žláz, nazývaných se velké ampulovitě. Řezáč et al. (2017) se

zaměřil na srovnání morfologie malých a velkých ampulovitých žláz u blízce příbuzných zástupců kribelátních a nekribelátních skupin pavouků v rámci nadčeledi Amaurobioidea, kde dle fylogenetické analýzy došlo nezávisle na sobě opakovaně ke ztrátě kribela (Spagna & Gillespie 2008; Miller et al. 2010; Dimitrov et al. 2016). Vlákná malých ampulovitých žláz slouží u kribelátních pavouků zejména jako podpora pro kribelátní vlášení. Celý tento komplex mohou doplňovat ještě vlákna parakribelátních a pseudoflageliforních žláz a má funkci adhezivního materiálu sloužícího k lovu kořisti (Peters 1987). Na rozdíl od kribelátních a parakribelátních žláz, které se u nekribelátních pavouků nikdy nevyskytují, ke ztrátě malých ampulovitých žláz ve většině případů nedošlo, a to dokonce ani u druhů, kde došlo ke ztrátě kribela již velmi dávno (Griswold et al. 2005; Murphy & Roberts 2015). Původní funkce malých ampulovitých žláz tak byla nutně nahrazena funkcí jinou. Zesilují vlákna velkých ampulovitých žláz (Work 1981; Peters & Koor 1991), jsou součástí přemostňujících vláken (Peters 1990; Peters & Koor 1991) a stabiliment (Tillinghast et al. 1981) či slouží k obalování ulovené kořisti (La Mattina et al. 2008).

U kribelátních zástupců nadčeledi Amaurobioidea jsou malé ampulovité žlázy rozvětvené (Řezáč et al. 2017). Toto rozvětvení může být obdobou jednoduchého prodloužení žlázy, díky čemuž je umožněna produkce většího množství materiálu. Téměř výhradní výskyt větvení u kribelátních zástupců však může být i důležitou adaptací pro formování kribelátního adhezivního svazku sloužícího k lovu kořisti. Rozvětvená sekreční část může vést k produkci asymetrického vlákna, kdy jedna polovina vlákna obsahuje více produktu než druhá, což může vést ke vzniku typického zvlněného vlákna, které tvoří podporu kribelátnímu vlášení (Řezáč et al. 2017).

Koncept větvení sekreční zóny malých ampulovitých žláz a taktéž velkých ampulovitých žláz u čeledi Agelenidae je unikátní mezi pavoučími snovacími žlázami. Důvodem této ojedinělosti může být složitější formování tekutého krystalu u větvených žláz vzhledem k různé orientaci proteinových molekul přitékajících z odlišných směrů (Řezáč et al. 2017). Větvení nemusí být pouze dvoučetné, ale u mnoha zástupců čeledi Agelenidae, kde pavouci staví velké horizontální sítě a potřebují tak také velké množství materiálu, jsou jak malé, tak velké ampulovité žlázy větvené mnohačetně (Řezáč et al. 2017).



U nekribelátních pavouků slouží vlákna malých ampulovitých žláz mimo jiné k posílení jednoho z nejvýznamnějších produktů snovacích žláz - vlečných vláken z velkých ampulovitých žláz (Work 1981; Peters & Kovoov 1991). Tato vlákna slouží zejména k jištění pavouka při lezení po vegetaci, využívá je při stavbě rámu a radiálních vláken sítě, pro šíření větrem (tzv. ballooning) apod. (viz kap. Literární rešerše; Kovoov 1987). Pro ukotvení vlečného vlákna je využíváno dalšího produktu, vlákna piriformních snovacích žláz (Apstein 1889; Wolff et al. 2015). Piriformní snovací žlázy jsou stejně jako velké ampulovité lokalizované na předních postranních snovacích bradavkách. U většiny araneomorfních pavouků vyúsťuje jedna velká ampulovitá žláza jedním velkým spigotem a několik piriformních žláz drobnými spigoty (Eberhard 2010). Ústup od tradičního uspořádání snovacích žláz na předních postranních snovacích bradavkách je velmi vzácný (Coddington 1989; Coddington & Levi 1991; Eberhard 2010; Murphy & Roberts 2015) a výjimečnou je v tomto ohledu taktéž čeleď Gnaphosidae (Wolff et al. 2017).

U této čeledi jsou spigoty piriformních žláz enormně zvětšené, zatímco spigot velké ampulovité žlázy je malý (Kovoov 1987; Platnick 1990; Murphy 2007). Tomu odpovídá i morfologie snovacích žláz, kdy piriformní žlázy jsou enormně zvětšené a zatažitelné. U rodu *Gnaphosa* a *Zelotes* (fylogeneticky odvozenější než bazální rod *Drassodes*) došlo taktéž k výrazné redukci velikosti velké ampulovité žlázy, u ostatních zástupců čeledi Gnaphosidae je taktéž patrná redukce sekreční části, zejména ampuly a zkrácení snovacího kanálku (Wolff et al. 2017). Toto uspořádání je výsledkem lovecké strategie, jelikož mnoho pavouků z této čeledi loví nebezpečnou kořist, jakou jsou mravenci nebo jiní pavouci (Bristowe 1958; Grimm 1985; Jarman & Jackson, 1986; Jäger 2002; Pekár et al., 2012). Pavouk při lovu obíhá kořist a ze spigotů piriformních žláz přitom vypouští silně adhezivní vlákno, které se snaží aplikovat přímo na končetiny či chelicery a kořist tak imobilizovat. Před aplikací piriformních vláken dojde k aktivaci piriformních spigotů (rozšíření a nafouknutí apexu snovacích bradavek vede k vysunutí spigotů a tlak proudícího vlákna vede k otevření spigotů), které jsou v klidovém stavu zataženy. Před použitím vlákna se pavouk snaží přímým kontaktem nejprve odhadnout velikost kořisti, a pokud usoudí, že kořist není nebezpečná, usmrtí ji bez aplikace vlákna (Wolff et al. 2017).

Změny v morfologii snovacích žláz vedou ke ztrátě schopnosti produkovat vlečné vlákno a k velmi omezené funkčnosti přichytných disků (Wolff et al. 2017). Aktivní způsob lovu bez použití lapací sítě a pozemní způsob života většiny druhů čeledi Gnaphosidae umožňuje absenci vlečného vlákna a přichytných disků ve prospěch zlepšení svých loveckých schopností. Výjimku tvoří mikárie *Arboricaria sociabilis* (Kulczyński, 1897), která loví mravence lužní (*Liometopum microcephalum* (Panzer, 1798)) a pohybuje se po kmenech starých dubů (Kůrka et al. 2015). Změny ve velikosti piriformních a velkých ampulovitých žláz u tohoto druhu nejsou natolik výrazné a vzhledem k nebezpečí pádu se také částečně zachovala schopnost tvořit přichytné disky (Wolff et al. 2017).

Zvětšení piriformních žláz umožňuje rychlou produkci velkého množství materiálu a velké spigoty umožňují produkci silnějšího vlákna, které je mechanicky odolnější (Wolff et al. 2017). Piriformní vlákno pavouků čeledi Gnaphosidae se skládá z centrálního jádra a lepivého obalu. Jak jádro, tak lepivá vrstva jsou tvořeny jednosměrně orientovanými nanofibrilami. Lepivý obal nese navíc ještě svrchní vrstvičku, tvořenou velmi tenkou vrstvou lepu. Pokud dojde k napínání vlákna, nejprve se objeví praskliny právě v této tenké svrchní vrstvě. Praskliny probíhají z vnějšího okraje kolmo na podélné centrální vlákno, které zamezí dalšímu šíření a zvětšování prasklin (Wolff et al. 2017). Piriformní vlákno testované u rodu *Drassodex* není tak pevné (0,5 GPa) jako vlečné vlákno křížáků (0,6–1,2 GPa), které je považováno za nejpevnější (Blackledge & Hayashi 2006). Je však mnohem pružnější než jakékoli jiné vlákno s výjimkou flageliformních vláken křížáků, která jsou až třikrát pružnější, ale zároveň nejsou tak pevná. Co se houževnatosti týče, dosahuje stejných hodnot jako u vlečných vláken křížáků (Denny 1976; Köhler & Vollrath 1995; Blackledge & Hayashi 2006; Wolff et al. 2017). Výjimečná pružnost a houževnatost piriformních vláken je důležitá pro úspěšnou imobilizaci bojující kořisti, kdy vlákna musí absorbovat vysoký mechanický stres.

Společně všechny tři články doplňují znalosti o histologických a morfologických charakteristikách kopulačních a snovacích orgánů araneomorfních pavouků a do budoucna kladou další otázky a otevírají nová pole působnosti pro další výzkum.

## 7. Seznam použité literatury II

- Aisenberg, A. & W.G. Eberhard. 2009. Possible cryptic female choice in a spider: female cooperation in making a copulatory plug depends on male copulatory courtship. *Behavioral Ecology* 20: 1236–1241.
- Alberti, G. & L.B. Coons. 1999. Acari – Mites. Pp. 515–1265. *In* *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. (F.W. Harrison, ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Apstein, C. 1889. Bau und Function der Spinndrüsen der Araneida. *Archiv für Naturgeschichte* 58: 29–74.
- Berendonck, B. & H. Greven. 2005. Genital structures in the entelegyne widow spider *Latrodectus revivensis* (Arachnida; Araneae; Theridiidae) indicate a low ability for cryptic female choice by sperm manipulation. *Journal of Morphology* 263:118–132.
- Blackledge, T. A. & Hayashi, C. Y. 2006. Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *Journal of Experimental Biology* 209: 2452–2461.
- Braun, R. 1956. Zur Biologie von *Teutana triangulosa* (Walck.) (Araneae; Theridiidae, Asageneae). *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 159: 255–318.
- Bristowe, W.S. 1958. *The world of spiders*. London: William Collins & Sons Ltd.
- Coddington, J.A. 1989. Spinneret silk spigot morphology: evidence for the monophyly of orbweaving spiders, Cyrtophorinae (Araneidae), and the group Theridiidae plus Nesticidae. *Journal of Arachnology* 17: 71–95.
- Coddington, J.A. & H.W. Levi. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual review of ecology and systematics* 22: 565–592.
- Cooke, J.A., 1966. Synopsis of the structure and function of the genitalia in *Dysdera crocata* (Araneae, Dysderidae). *Senckenbergiana Biologica* 47: 35–43.
- Coyle, F.A., F.W. Harrison, W.C. McGimse & J.M. Palmer. 1983. Observations on the structure and function of spermathecae in haplogyne spiders. *Transactions of the American Microscopical Societa* 102:272–280.7
- Denny, M. 1976. The physical properties of spider's silk and their role in the design of orb-webs. *Journal of Experimental Biology* 65(2): 483–506.

- Dimitrov, D., L.R. Benavides, M.A. Arnedo, G. Giribet, C.E. Griswold, N. Scharff, G. Hormiga. 2016. Rounding up the usual suspects: a standard target-gene approach for resolving the interfamilial phylogenetic relationships of ecribellate orb-weaving spiders with a new family-rank classification (Araneae, Araneoidea). *Cladistics* doi: 10.1111/cla.12165.
- Eberhard, W.G. 2004. Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. *Journal of Arachnology* 32: 545–556.
- Eberhard, W.G. 2010. Possible functional significance of spigot placement on the spinnerets of spiders. *Journal of Arachnology* 38: 407–414.
- Glatz, L. 1967. Zur biologie und morphologie von *Oecobius annulipes lucas* (Araneae, Oecobiidae). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 61(2): 185–214.
- Grimm, U. 1985. Die Gnaphosidae Mitteleuropas (Arachnida, Araneae). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg, (NF)* 26: 1–318.
- Griswold, C.E., M.J. Ramírez, J.A. Coddington & N.I. Platnick. 2005. Atlas of phylogenetic data for entelegyne spiders (Araneae: Araneomorphae: Entelegynae) with comments on their phylogeny. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56: 1–324.
- Jäger, P. 2002. Über eine bemerkenswerte Verhaltensweise von *Scotophaeus scutulatus* (Araneae: Gnaphosidae). *Arachnol. Mitt.* 24: 72–75.
- Jarman, E.A. & R.R. Jackson. 1986. The biology of *Taieria erebus* (Araneae, Gnaphosidae), an araneophagic spider from New Zealand: silk utilisation and predatory versatility. *New Zealand Journal of Zoology* 13: 521–541.
- Knoflach, B. 1998. Mating in *Theridion varians* Hahn and related species (Araneae: Theridiidae). *Journal of Natural History* 32: 545–604.
- Knoflach, B. 2004. Diversity in the copulatory behaviour of combfooted spiders (Araneae, Theridiidae). *Denisia NF* 14:161–256.
- Köhler, T. & Vollrath, F. 1995. Thread biomechanics in the two orb-weaving spiders *Araneus diadematus* (Araneae, Araneidae) and *Uloborus walckenaerius* (Araneae, Uloboridae). *Journal of Experimental Zoology* 271: 1–17.
- Kovoor, J. 1987. Comparative structure and histochemistry of silk-producing organs in arachnids. Pp. 160–186. *In Ecophysiology of Spiders* (Nentwig, W., ed.). Springer Berlin Heidelberg.

- Kovoor, J. & H.M. Peters. 1988. The spinning apparatus of *Polonecia producta* (Araneae, Uloboridae): structure and histochemistry. *Zoomorphology* 108(1): 47–59.
- Kraus, O. & M. Kraus. 1988. The genus *Stegodyphus* (Arachnida, Araneae). Sibling species, species groups, and parallel origin of social living. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* 30: 151–254.
- Krejčí, T., M. Řezáč & P. Michalik. 2015. Female genital morphology and sperm storage in the velvet spider *Eresus kollari* (Araneae: Eresidae). *Journal of Arachnology* 43(2): 182–187.
- Kůrka, A., M. Řezáč, R. Macek & J. Dolanský. 2014. Atlas pavouků České republiky. Academia, Praha (The Atlas of spiders in the Czech Republic) (in Czech). Pp. 621.
- Lopez, A. 1987. Glandular aspects of sexual biology. Pp. 121–132. *In* *Ecophysiology of spiders* (Nentwig, W., ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Mattina, C., R. Reza, X. Hu, A.M. Falick, K. Vasanthavada, S. McNary, et al. 2008. Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey wrapping silk in the cob weaver *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 47: 4692–4700.
- Michalik, P., W. Reihner, M. Suhm-Tintelnot, F.A. Coyle & G. Alberti. 2005. Female genital system of the folding-trapdoor spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): ultrastructural study of form and function with notes on reproductive biology of spiders. *Journal of Morphology* 263: 284–309.
- Miller, J.A., A. Carmichael, M.J. Ramírez, J.C. Spagna, C.R. Haddad, M. Řezáč, J. Johannesen, J. Král, X. Wang & C.E. Griswold. 2010. Phylogeny of entelegyne spiders: affinities of the family Penestomidae (new rank), generic phylogeny of Eresidae, and asymmetric rates of change in spinning organ evolution (Araneae, Araneoidea, Entelegynae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:786–804.
- Miller, J., C. Griswold, N. Scharff, M. Řezáč, T. Szuts & M. Marhabaie. 2012. The velvet spiders: an atlas of the Eresidae (Arachnida, Araneae). *ZooKeys* 195: 1–144.
- Murphy, J. 2007. *Gnaphosid genera of the world*. St Neots, Cambs, UK: British Arachnological Society.

- Murphy J.A. & M.J. Roberts. 2015. Spider Families of the World and Their Spinnerets. British Arachnological Society, York.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Reviews of Entomology* 19:61–80.
- Noirot, C. & A. Quennedey. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annales de la Société Entomologique de France (NS)* 27: 123–128.
- Pekár, S., J.A. Coddington & T.A. Blackledge. 2012. Evolution of stenophagy in spiders (Araneae): evidence based on the comparative analysis of spider diets. *Evolution* 66: 776–806.
- Peters, H.M. 1984. The spinning apparatus of Uloboridae in relation to the structure and construction of capture threads (Arachnida, Araneida). *Zoomorphology* 104(2): 96–104.
- Peters, H.M. 1987. Fine structure and function of capture threads. Pp. 187–202. *In* *Ecophysiology of spiders* (Nentwig, W., ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Peters, H.M. 1990. On the structural and glandular origin of the bridging lines used by spiders for moving to distant places. *Acta Zoologica Fennica* 190 :309–314.
- Peters, H.M. 1993. Über das problem der stabilitnente in spinnennetzen. *Zoologische Jahrbücher Physiologie*. 97: 245–64.
- Peters, H.M. & J. Kovoov. 1989. Die Herstellung der Eierkokons bei der Spinne *Polonecia producta* (Simon, 1873) in Beziehung zu den Leistungen des Spinnapparates. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 93(1): 125–144.
- Peters, H.M. & J. Kovoov. 1991. The silk-producing system of *Linyphia triangularis* (Araneae, Linyphiidae) and some comparisons with Araneidae. *Zoomorphology* 111: 1–17.
- Platnick, N.I. 1990. Spinneret morphology and the phylogeny of ground spiders (Araneae, Gnaphosoidea). *American Museum Novitates* 2978: 1–42.
- Řezáč, M., T. Krejčí, S. Goodacre, C.R. Haddad & V. Řezáčová. 2017. Morphological and functional diversity of minor ampullate glands and silk in spiders from the superfamily Amaurobioidea (Entelegynae: RTA clade). *Journal of Arachnology* 45: 198–208.

- Rosenberg, J. 1983. Coxal organs of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). Fine structural investigation with special reference to the transport epithelium. *Cell and Tissue Research* 230: 421–430.
- Rosenberg, J., C.H.G. Müller & G. Hilken. 2006. Ultrastructural organization of the anal organs in the anal capsule of *Craterostigma tasmanianus* Pocock, 1902 (Chilopoda, Craterostigmomorpha). *Journal of Morphology* 267: 265–272.
- Spagna, J.C. & R.G. Gillespie. 2008. More data, fewer shifts: Molecular insights into the evolution of the spinning apparatus in non-orb-weaving spiders. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 347–368.
- Suhm, M. & G. Alberti. 1993. The fine structure of the spermatheca of *Amaurobius fenestralis* (Stroem, 1768) (Amaurobiidae, Araneae). *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali* 26: 343–353.
- Suhm, M., K. Thaler & G. Alberti. 1996. Glands in the male palpal organ and the origin of the mating plug in *Amaurobius* species (Araneae: Amaurobiidae). *Zoologischer Anzeiger* 234: 191–199.
- Tillinghast, E.K., E.J. Kavanagh & P.H. Kolbjornsen. 1981. Carbohydrates in the webs of *Argiope* spiders. *Journal of Morphology* 169(2): 141–148.
- Uhl, G. 1994a. Genital morphology and sperm storage in *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75:1–12.
- Uhl, G. 1994b. Ultrastructure of the accessory glands in female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). *Acta Zoologica* 75:13–25.
- Uhl, G. 1996. Sperm storage secretion of female cellar spiders (*Pholcus phalangioides*; Araneae): a gel-electrophoretic analysis. *Journal of Zoology* 240(1): 153–161.
- Uhl, G. 2000. Two distinctly different sperm storage organs in female *Dysdera erythrina* (Araneae: Dysderidae). *Arthropod Structure & Development* 29: 163–169.
- Uhl, G. 2002. Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). Pp. 145–156. *In* European arachnology 2000. (Toft, S. & N. Scharff, eds.). Aarhus University Press, Aarhus.
- Useta, G., B.A. Huber & F.G. Costa. 2007. Preliminary data on spermathecal morphology and sperm dynamics in the female *Schizocosa maliciosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology* 104: 777–785.

- Wolff, J.O., I. Grawe, M. Wirth, A. Karstedt & S.N. Gorb. 2015. Spider's super-glue: thread anchors are composite adhesives with synergistic hierarchical organization. *Soft Matter* 11: 2394–2403.
- Wolff, J.O., M. Řezáč, T. Krejčí & S.N. Gorb. 2017. Hunting with sticky tape: Functional shift in silk glands of araneophagous ground spiders (Gnaphosidae). *Journal of Experimental Biology* 220: 2250–2259.
- Work, R.W. 1981. Web components associated with the major ampullate silk fibers of orb-web-building spiders. *Transactions of the American Microscopical Society* 100: 1–20.