

**Estructuración genética y variación morfológica
en ambientes fluviales y oceánico-estuarinos en
la araña *Allocosa brasiliensis* (Lycosidae) del sur
de Uruguay**

Tesis de Maestría en Biología

Opción Zoología

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

(PEDECIBA)

Lic. Rodrigo Postiglioni

Orientador: Dr. Miquel Arnedo, Universitat de Barcelona

Co-orientador: Dr. Miguel Simó, UdelaR.

Montevideo, 2015.

Lista de contenidos

Agradecimientos	1
Resumen	3
Introducción general	4
Las arañas lobo: taxonomía y su problemática.....	4
El sujeto de estudio.....	5
El problema a abordar.....	8
Objetivos: general y específicos.....	8
Preguntas que busca responder la Tesis.....	8
Capítulo 1	
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	23
Discusión.....	30
Capítulo 2	
Introducción.....	37
Materiales y Métodos.....	39
Resultados.....	44
Discusión.....	64
Conclusiones finales	70
Bibliografía	71
Anexo	88

*“En la Naturaleza, la verdad supera en belleza a todo lo que puedan imaginar nuestros poetas,
que son los únicos encantadores que existen”.* Konrad Lorenz.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a todos los que se tomaron un rato para venir a la defensa, muchas gracias.

A los miembros del tribunal por sus críticas y aportes a la tesis que aumentaron considerablemente la calidad del trabajo, por compartir sus conocimientos con paciencia y grandiosa disposición.

A CSIC y PEDECIBA por el apoyo económico sin el cual no hubiera sido posible mi ida a Barcelona y por los dos años de beca.

Quiero también agradecer a mis tutores. A Miquel Arnedo, por aceptar el desafío de orientarme sin siquiera conocerme, por sus valiosísimos aportes en todas las etapas de la tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y poner a mi disposición todo lo que estuvo a su alcance, por su confianza y por haberme enseñado también mucho de lo que ahora sé, incluso a tenerme confianza en las ciencias místicas y en su rama llamada Biología Molecular. Visca Catalunya terra lliure!! A Miguel Simó por aceptar orientarme, incluso conociéndome, por su paciencia de escalas inimaginables, también por haberme enseñado tanto de lo que ahora sé, por apoyarme en todas mis decisiones, transmitirme calma en los momentos más difíciles, por ser un gran compañero de trabajo, por hacer los almuerzos más divertidos, es como Cacho de la Cruz pero de la arcnología. Salú Migue!! Este logro es compartido!!

A mi familia, mis padres (Leonardo y Estela) y hermanos (Camilo, Paola y Natalia), por apoyarme siempre en los caminos que he elegido, por bancarse ausencias en momentos importantes mientras yo andaba buscando bichos por ahí. A mis tíos Mabel y Nestor y la prima Mariana y fía, Sabina y Pablo Telesca por facilitarme enormemente la colecta por Mercedes. A mi suegro Alvaro “Anciano” Furtado por haber hecho posible la colecta en la Laguna Merín. A los demás Furtado, De Álava y afines por hacerme sentir como uno más, a Vera, Felipe, Inés, Flor, Bea, Diana y Héctor muchísimas gracias también.

A la familia que uno elige: Paul, Font (y Juli), Carlita, hermanos del alma. No me imagino lo que sería de mi vida sin ustedes.

A Olga, Cássia y Mandrake por regalarme su ternura felina todos los días.

A mis compañeros del LEEE, a Anita por ser mi referente y aguantarme la cabeza (toda) siempre los últimos 14 años, a Costa (por abrirme las puertas del laboratorio y por transmitirme el gusto por la naturaleza y su divulgación), Toscano, Maca, la Sole, Mariana, Estefanía, Agustín, Gustavo, Andrea, Anita C, Matilde, Fabiana, Lorena, Irene, Laura, María José por ser parte de ese ambiente de trabajo tan heterogéneo y divertido que hace que den ganas de trabajar mejor.

A mis compañeros de Entomología, a Alvaro (que no necesita PhD pa’ ser el doctor), a la Negra (y al poroto-sandía-Renzo!), Perafán, Demian, Carolina Rojas, Manuel, Marcelo, Estrellita, Carmen, Enrique, Ana, Patricia, Virginia, Mónica, Carolina Jorge, Gabriela, Analisa. Muchas gracias por su continua disposición y cordialidad para hacer un gran ambiente de trabajo. Sepan que el tiempo que compartimos durante los prácticos aprendí mucho con todos ustedes.

A Andrés "Negro" Iriarte por sus valiosos consejos, para la tesis y la vida misma.

A la gente maravillosa que conocí en Barcelona, por dedicar mucho de su tiempo en ayudarme a que hoy sea posible estar hablando de cosas que nunca en la vida había experimentado: Eli, Paola, Gema, Pedro, Vera, Enric, Margarita y Carles, y a toda la gente del Departamento por los almuerzos espectaculares, en Catalá per descomptat.

A Yhara, Gustavo y Antonella por haberme adoptado por 3 meses en su casa como uno más de la familia, con todo lo que ello implica. Muchísimas gracias!!!

A Martín Salgueiro por mostrarme parte de la hermosa Catalunya y por darme cobijo y alimento la desesperada noche en que me quedé sin transporte de regreso.

A Yolanda González del IECA por compartir desinteresadamente sus conocimientos de extracción de sales, por enseñarnos a pescar y no darnos el pescado.

A Angel Segura, Carla Kruk, Marcel Rodríguez y la gente de Limnología de Facultad de Ciencias por su disposición para la toma de las medidas de salinidad.

A Gabriel De Simone, Luis Piacentini, Matías Izquierdo, Maca González y Nelson Ferretti por los malabares al mejor estilo *Cirque du Soleil* para enviarme material de Argentina a España.

A Luiz Ernesto Costa Schmidt por enseñarme mucho de lo que se de morfometría lineal y geométrica.

A la gente del servicio de granulometría del Dpto. de Evolución de Cuencas por el análisis sin cargo de las muestras.

A la colorada 150cc y al blanquito por llevarnos a tantos destinos en busca de bichos y por traernos siempre a salvo y con la tranquilidad del deber cumplido.

Y por supuesto a Adri, por ser mi compañera de vida de estos últimos 2912 días, mi confidente, referencia y cable a tierra, por ser gran colectora de Allocosas, planificadora y agitadora de salidas de campo, por dedicar parte de sus vacaciones y tiempo de rascado corporal para coleccionar bichos, por bancarme a la distancia y luego durante el trabajo en Barcelona. Y especialmente por quererme como soy, por elegirme todos los días y por ayudarme también todos los días a ser un más y mejor yo.

Gracias a toda la gente que hace lo posible para que los demás progresen y sigan creciendo.

RESUMEN

Allocosa brasiliensis es una araña lobo perteneciente a una subfamilia con una gran homogeneidad en sus estructuras genitales y dificultades en su taxonomía y sistemática. Esta especie habita arenas costeros oceánicos y estuarinos (COE) y también fluviales y lagunares (CI) de Uruguay, sur de Argentina y Brasil, ambientes a los que está altamente especializada. Observaciones en la naturaleza sugieren que individuos de COE y CI presentarían diferencias en coloración y tamaño. Estos ambientes también presentan diferencias en sus condiciones tanto actuales (niebla salina, desplazamiento eólico de arenas, inundaciones) como históricas (cambios en el nivel del mar en el Pleistoceno y Holoceno). La migración a través de *ballooning* no sería ventajosa debido a su alta especificidad, restringiendo a los ambientes costeros sus capacidades de movimiento. Estos elementos podrían explicar las diferencias morfológicas observadas, al igual que la estructuración genética en el espacio. Las hipótesis puestas a prueba fueron: 1) La estructuración genética en el espacio son congruentes con las cuencas que habitan, 2) El tamaño corporal de individuos de CI sería menor y con patas más largas que los de COE. El objetivo de la tesis fue estudiar la variación molecular y morfológica de *A. brasiliensis* en distintos tipos de costas del sur de Uruguay. Para el análisis molecular se utilizaron adultos de *A. brasiliensis* de 13 localidades representando 3 cuencas importantes del sur de Uruguay y zonas próximas. También se incluyeron individuos de *A. brasiliensis* de localidades de Brasil y Argentina y representantes de *A. alticeps* de Uruguay y Argentina. Se obtuvieron 60 secuencias de 676 pb del gen *cox1* (17 haplotipos) y 445 loci polimórficos de AFLPs. La información brindada por ambos marcadores es coincidente en la ausencia de estructuración espacial de la diversidad genética. También apoyarían la existencia de un proceso de expansión poblacional reciente precedido de un cuello de botella. La capacidad de dispersión de la especie y fenómenos geológicos y climáticos recientes explicar los patrones genéticos observados. Para el análisis morfológico se utilizaron hembras adultas de *A. brasiliensis* de 5 localidades del sur de Uruguay, incluyendo COE y CI de las 3 cuencas consideradas. Se tomaron medidas de ancho de cefalotórax; Fémur y segmento Patela-Tibia de Pedipalpos y Patas I y II; y también parámetros de sus epiginos (largo y ancho de la placa, interdistancia entre orificios copulatorios así como sus diámetros mayores y menores). Se realizaron comparaciones globales y pareadas entre localidades, con y sin correcciones mediante covariable (tamaño corporal). Se encontraron marcadas diferencias en el tamaño corporal, siendo menores los de costas fluviales que los de estuario, aunque las de costa oceánica fueron más pequeñas que éstos. La hipótesis planteada estaría apoyada parcialmente. Se encontraron diferencias en las longitudes proporcionales de Pedipalpos y Patas, sin hallarse patrones con el tipo de ambiente. Tampoco se encontraron relaciones entre las variables morfométricas y el tamaño de grano promedio y la salinidad de la arena. Las medidas de genitalias mostraron diferencias entre las localidades. Las comparaciones corregidas de las interdistancias entre orificios copulatorios y los diámetros menores de los mismos sin corregir no mostraron diferencias entre localidades. Se discute el posible uso de estos caracteres con fines taxonómicos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las arañas lobo: taxonomía y su problemática

El orden Araneae constituye un grupo megadiverso con más de 44000 especies (World Spider Catalog 2015), distribuido en la mayor parte de los ecosistemas terrestres, excepto en la Antártida (Coddington & Levi 1991). Son depredadores generalistas, responsables de buena parte del control de poblaciones de otros artrópodos, particularmente insectos (Foelix 2011).

Dentro de las arañas, Lycosidae es una familia monofilética (Griswold, 1993) y presenta alta diversidad, ocupando el cuarto lugar del Orden con 120 géneros y 2403 especies (World Spider Catalog 2015). Los licósidos o arañas lobo son animales errantes de suelo que capturan sus presas activamente (Foelix 2011). Existen grandes interrogantes acerca del estatus taxonómico y las relaciones filogenéticas a nivel de superfamilias (Griswold 1993) y subfamilias (Dondale 1986), como también a nivel de diversos complejos de especies gemelas (Uetz & Dondale 1979, Costa & Capocasale 1984, Costa & Francescoli 1991, Simó et al. 2002, Huber 2004). Tradicionalmente, el conocimiento sistemático de la familia estuvo sustentado principalmente sobre caracteres morfológicos, tanto genitales como somáticos. En el caso particular de la delimitación de las especies, los caracteres genitales han sido los más utilizados (Eberhard 2004, 2008, 2010, Eberhard & Huber 2010, Huber 2004). Sin embargo, Lycosidae es considerada como una familia donde los caracteres genitales son poco variables o conservados, lo cual dificulta la tarea sistemática (Vink et al. 2002, Murphy et al. 2006). Una de las estrategias clásicamente utilizadas en la distinción de especies gemelas ha sido mediante el estudio de experimentos de aislamiento reproductivo, particularmente basados en elementos etológicos (Hollander & Dijkstra 1974, Uetz & Denternein 1979, Stratton & Uetz 1981, Costa & Capocasale 1984, Costa & Francescoli 1991, Aisenberg & Costa 2008). Más recientemente, estudios moleculares han aportado valiosa información para esclarecer el estatus taxonómico de diferentes grupos de arañas, incluyendo licósidos (Bidegaray-Batista & Arnedo 2011, Montes de Oca et al. 2012, Macías-Hernández et al. 2012, Vink et al. 2002, Esquivel-Bobadilla et al. 2013). Asimismo, otra técnica que utiliza la morfología genital y somática de los individuos es la morfometría lineal, la cual ha sido utilizada en la distinción a

nivel de especies en géneros tales como *Trochosa* y *Schizocosa* (Stratton 2005, Hepner & Milasowsky 2006).

El sujeto de estudio

La subfamilia Allocosinae comprende arañas que presentan una simplificación morfológica de la genitalia femenina cuyo epigino se caracteriza por ser aplanado, sin lóbulos ni atrios, con orificios copuladores simples y pequeños (Dondale, 1986). Por su parte, las genitalias masculinas también serían muy similares entre diferentes especies (Simó, com. pers.). En consecuencia se detectan grandes dificultades en la obtención de caracteres taxonómicos diagnósticos y plantean dudas sobre el estatus taxonómico de muchas especies. Actualmente la subfamilia está representada por el género *Allocosa* (Banks 1900) que incluye especies neárticas y neotropicales, aunque estas últimas han sido poco estudiadas a nivel taxonómico (Dondale & Redner 1983, Capocasale 1990).

Allocosa brasiliensis (Petrunkevitch, 1910), es una araña lobo (Lycosidae) estrechamente ligada a los arenales costeros de Uruguay, sur de Brasil y Argentina. Esta especie es un excelente modelo para trabajos evolutivos, ecológicos y comportamentales (Aisenberg & Costa 2008, Aisenberg et al. 2011a, Aisenberg et al. 2011b, Ghione et al. 2013). Esta especie constituye uno de los primeros casos de arañas con inversión en los roles sexuales típicos, donde las hembras constituyen el sexo móvil y los machos elaboran cuevas que ceden luego de la cópula (Aisenberg & Costa 2008). También presenta una inversión tanto en el dimorfismo sexual típico en las arañas (los machos más grandes que las hembras), como también en el canibalismo sexual, en donde los machos son capaces de alimentarse de hembras de bajo valor reproductivo (Aisenberg et al. 2007, Aisenberg et al. 2011a). Desde el punto de vista de la conservación, *A. brasiliensis* ha demostrado ser un gran candidato como indicadora del grado de impacto sobre los ambientes compuestos por dunas abiertas fijadas por vegetación psamófila, reflejando su gran especificidad a este tipo de ambientes (Aisenberg et al. 2011b, Ghione et al. 2013).

Allocosa brasiliensis encuentra estrechamente asociada tanto a arenales costeros del Río de la Plata y Océano Atlántico como también a los de ríos, arroyos y lagunas (Capocasale

1990). Observaciones de campo han mostrado que existen diferencias morfológicas entre los individuos hallados en ambos tipos de costa: la oceánico-estuarina (COE) y las de ríos, arroyos y lagunas (costa interior, CI). Dichas diferencias pueden observarse en la coloración y tamaño (individuos de CI con mayor pigmentación y tamaño que las de COE) (Fig. 1). Las mismas carecen aparentemente de valor taxonómico.

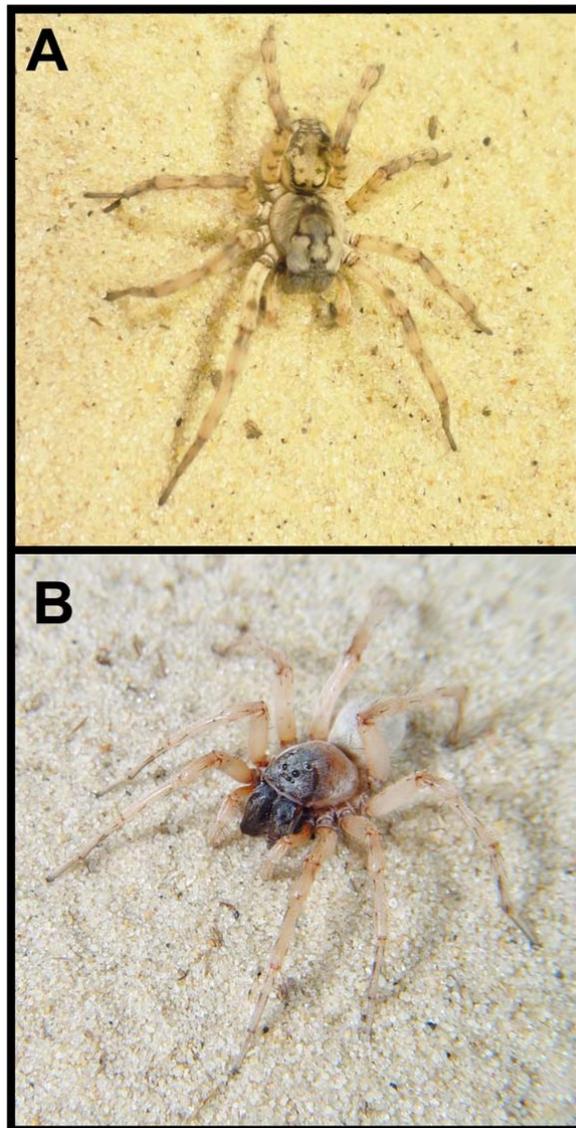


Figura 1 – Diferencias de pigmentación observadas entre individuos pertenecientes a CI (A) y a COE (B).

Son notorias también las diferencias que muestran ambos tipos de costa, tanto actuales como históricas. La COE es un tipo de ambiente que contiene dunas móviles, cuya cobertura vegetal generalmente no supera el metro de altura, con especies perfectamente adaptadas a la escasez de agua a causa del sustrato arenoso (Alonso-Paz & Bassagoda 2006). Este tipo de ambientes también se encuentran expuestos a permanentes y ocasionalmente fuertes vientos provenientes del mar, cargados de agua salada generando la llamada niebla salina (Menafrá et al. 2006). En tiempos geológicos, la historia reciente de la COE habría sufrido importantes cambios desde el Pleistoceno tardío – Holoceno temprano, relacionados con oscilaciones en el nivel del mar. Aproximadamente hace 29 – 57 ka (miles de años antes del presente), nuestra región se encontraba bajo la influencia del último máximo glacial, en donde el mar se encontraba entre 120 y 130 metros por debajo del nivel actual (Peltier 2004). Se ha postulado que durante este periodo el paleo curso del Río de la Plata (la conjunción de los ríos Paraná y Uruguay) corría paralelo a la costa actual de Uruguay y desembocaba en el Océano Atlántico en un delta ubicado en el borde de la plataforma continental (MTOPI 1979). Hacia los 25 ka (miles de años antes del presente) el nivel del mar habría comenzado a subir de forma sostenida dando origen a un estuario. El aumento en el nivel del mar se habría mantenido hasta alcanzar un máximo en los 6 ka, llegando a +5 m sobre el nivel actual. Este evento corresponde a la máxima transgresión Holocénica ocurrida en la región (Bracco et al. 2011, 2014, Martínez & Rojas 2006, 2011, 2013, 2014). Por su parte, las CI se encuentran sometidas de forma impredecible a frecuentes inundaciones, generalmente provocadas por las precipitaciones regionales y/o las ocurridas corriente arriba. Durante estos periodos el agua cubre completamente y en ocasiones desplaza buena parte de los arenales costeros. En términos históricos, las CI no habrían sufrido las consecuencias de los eventos de transgresiones marinas durante el Holoceno. El mayor efecto lo habrían sufrido aquellas cuencas más vinculadas al Río de la Plata u Océano Atlántico, en particular en las zonas cercanas a su desembocadura (Martínez & Rojas 2006). Sin embargo, cuerpos de agua como las lagunas costeras de Maldonado, Rocha, Laguna Merín y Laguna de los Patos del sur de Brasil (correspondientes a CI) habrían estado íntimamente relacionados con los eventos de transgresiones y regresiones marinas comentadas anteriormente. Por lo tanto, es posible

afirmar que las poblaciones localizadas sobre estas costas tienen como máximo 6 ka, puesto que antes de ese momento se encontraban bajo el agua.

El problema a abordar

Las presiones ambientales a las cuales se ven sometidos los organismos que habitan tanto en la COE como en CI son distintas. Estas presiones podrían ser responsables de los patrones morfológicos encontrados en *A. brasiliensis* en uno y otro ambiente, asimismo podrían dar cuenta de eventuales estructuraciones de la diversidad genética en el espacio geográfico. Para aportar información acerca de la estructuración genética y variación morfológica de las poblaciones de *A. brasiliensis* en estos dos tipos de ambientes se propone la utilización de marcadores moleculares y de medidas corporales a través de la morfometría lineal debido al alcance de esta herramienta sobre los caracteres involucrados en la biología de la especie.

Objetivos

General

- Estudiar la variación molecular y morfológica de la araña lobo de las dunas, *Allocosa brasiliensis*, en distintos tipos de costas del sur de Uruguay.

Específicos

- Analizar la estructuración geográfica de la diversidad genética en las *Allocosa brasiliensis* del sur de Uruguay y zonas cercanas.
- Comparar la variabilidad morfológica de representantes de *Allocosa brasiliensis* de costas fluviales y costas oceánico-estuarinas.

Preguntas que busca responder la tesis

- ¿Existe estructuración molecular espacial en las cuencas habitadas por *A. brasiliensis*?

Hipótesis: *Allocosa brasiliensis* posee una estructuración espacial congruente con las cuencas que habita debido a la alta especialización a los arenales costeros y a los altos costos de establecimiento que tendría el desplazamiento a largas distancias como el *ballooning*.

Predicción: La estructuración genética en el espacio geográfico de *A. brasiliensis* pondrá de manifiesto dichas restricciones en el flujo de individuos de la especie.

- ¿Hay diferencias morfológicas entre individuos de *A. brasiliensis* pertenecientes a distintos tipos de costa?

Hipótesis: *Allocosa brasiliensis* presenta diferencias morfológicas congruentes con las presiones ambientales a las que están sometidas en los dos tipos de costa analizados. Las COE poseen dunas móviles que incrementan la dinámica del ambiente y las CI presentan inundaciones pronunciadas e impredecibles.

Predicción: Estas presiones se verán reflejadas en un tamaño corporal mayor en localidades con COE e individuos más pequeños t con patas proporcionalmente más largas en sitios con CI.

Capítulo 1 – Análisis de la estructuración espacial de la diversidad genética en *Allocosa brasiliensis* utilizando marcadores mitocondriales y nucleares.

INTRODUCCIÓN

La Filogeografía es una subdisciplina de la Biogeografía que estudia la estructuración de los linajes genéticos en el espacio geográfico, tanto a nivel específico como poblacional (Avice et al. 1987, Avice 2000). Dicha disciplina está abocada al análisis de los procesos ocurridos en el pasado que dieron lugar a los patrones de variabilidad genética observados en el presente. De esta manera es posible proponer hipótesis testeables acerca de eventos ocurridos a nivel poblacional tales como vicarianza, flujo génico, expansiones o reducciones demográficas (Avice 2000, Knowles & Maddison 2002, Garrick et al. 2010). Una de las fuentes de información más utilizadas por la Filogeografía ha sido el genoma mitocondrial (ADNmit), debido a su capacidad de proveer información sobre procesos tanto micro como macroevolutivos (Avice et al. 1987). Este genoma se encuentra presente en gran abundancia en los tejidos, por lo que las posibilidades de amplificación en distintos estudios se ven favorecidas (Ballard & Whitlock 2004). Además, el ADNmit posee un número poblacional efectivo inferior al del ADN nuclear, por lo que es capaz de manifestar más rápidamente los procesos poblacionales estocásticos, particularmente en poblaciones pequeñas (Avice et al. 1987, Ballard & Whitlock 2004). Sin embargo posee algunas desventajas. Su transmisión ocurre por vía materna, por lo cual la interpretación de los patrones y eventos poblacionales podría ser incompleta, especialmente en especies con marcados sesgos sexuales en su dispersión (Hare 2001, Ballard & Whitlock 2004). Además el ADNmit no posee recombinación, por lo que cualquier presión selectiva sobre una región particular del genoma afectará a toda la molécula por igual. De esta manera las inferencias de procesos poblacionales a partir los patrones observados también podrían conducir a errores (Hare 2001, Ballard & Whitlock 2004). Por otra parte se ha observado que en especies filogenéticamente próximas los árboles de las especies no siempre coinciden con los árboles obtenidos a partir de genes, en particular los

que utilizan un locus (Maddison 1997). A medida que las preguntas en Filogeografía se han ido complejizando una medida para afrontar estas dificultades ha sido el abordaje multilocus (Hare 2001, Bidegaray-Batista et al. 2011, Thomson et al. 2010, Brewer et al, 2014). Dicho enfoque implica la utilización de más de un locus independiente, generalmente de origen nuclear. Esto no implica excluir al genoma mitocondrial, sino que el mismo debe ser considerado como un único locus. Así la información brindada de manera independiente por cada locus se analizará en conjunto, puesto que los fenómenos poblacionales afectan a los organismos y por lo tanto a todo su genoma (Hare 2001, Bidegaray-Batista et al. 2011, Thomson et al. 2010, Brewer et al, 2014). Dentro de los marcadores nucleares, los que reflejarían información de sucesos poblacionales serían los ANMs (*Anonymous Nuclear Markers*). Debido a su elevada variabilidad dichos marcadores deben ser explorados para cada grupo de especies, lo cual representa un esfuerzo adicional en especies poco estudiadas (Thomson et al 2010, Bidegaray-Batista et al 2011). Otros marcadores nucleares también utilizados a nivel poblacional son los microsatélites, los cuales cuentan con dificultades similares a las de los ANMs debido a su alta variabilidad (Rütten et al 2001, Ji et al. 2004, Bilde et al. 2009, Tieppo Da Silveira & Bonatto 2009, Duncan et al. 2010, Thomson et al. 2010, Hataway et al. 2011, Esquivel-Bobadilla et al., 2013). Una herramienta auspiciosa para superar estas dificultades en un futuro próximo es la secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*), cuyo desarrollo actual la hace cada vez más accesible (Thomson et al. 2010, Brewer et al. 2014). Cuando no se dispone de información de base, una forma de analizar múltiples loci nucleares es mediante la utilización de los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos et al. 1995). Estos son marcadores de alta resolución, que consisten en un conjunto de patrones individuales de fragmentos de ADN de diferente tamaño, que a grandes rasgos se obtienen a partir del efecto combinado de dos tipos de reacciones: la acción de enzimas de restricción sobre el genoma (mayormente nuclear) y la posterior amplificación por PCR. Si bien los AFLP no permiten distinguir altos niveles de polimorfismo, se han utilizado en una amplia gama de organismos tanto en estudios filogenéticos, como en análisis poblacionales y para la determinación de paternidad, lo cual da cuenta de su amplia versatilidad (Lucchini 2003, Bensch & Åkesson 2005, Dasmahapatra 2005). Esta técnica ha sido extensamente utilizada en artrópodos para el análisis de la diversidad genética (Mendelson & Shaw 2005). En arañas, los

AFLP han sido aplicados con éxito para medir el nivel de parentesco entre grupos de arañas sociales (Bilde et al 2005, Smith et al 2009) o para establecer la estructuración poblacional en terídidos y arañas lobo con derivaciones en la taxonomía de estos grupos (Lambeets et al 2010, Croucher et al 2011, Eraly 2012).

Allocosa brasiliensis es una especie de araña lobo estrictamente ligada a arenales costeros oceánicos, fluviales y lagunares del sur de Sudamérica (Capocasale 1990, Costa et al. 2006). Esta especie ha mostrado características muy particulares en lo que refiere a su ecología, morfología, comportamiento y estrategias reproductivas, razones que la han convertido en un excelente modelo de estudio (Aisenberg & Costa 2008, Aisenberg et al. 2011a, Aisenberg et al. 2011b, Ghione et al. 2013). Cabría esperar que otros comportamientos, como los relacionados con la dispersión, también hayan sido moldeados por las presiones ambientales impuestas por los arenales costeros. El *ballooning* es un modo de dispersión aéreo a larga distancia ampliamente extendido en distintos grupos de arañas, generalmente en juveniles. Este comportamiento consiste en la suspensión aérea generada por la liberación de hilos de seda que se incorporan a corrientes de aire (Foelix 2011). El *ballooning* poseería costos asociados al establecimiento, es decir, a la probabilidad del éxito de sobrevivencia en el sitio al cual arriban (Bonte 2013). Dichos costos podrían ser altos en especies altamente especializadas a determinados tipos de ambientes, por lo que no sería esperable su presencia en *A. brasiliensis*. Sin embargo, este comportamiento también podría garantizar la continuidad de la especie en ambientes inestables y dinámicos (Greenstone 1982). El flujo de individuos podría darse también a través de los ríos en los momentos de bajante causada por sequías, pudiendo cursar los sedimentos que han quedado al descubierto. Observaciones en condiciones naturales han mostrado que *A. brasiliensis* es también capaz de desplazarse sobre el agua (Costa com pers.). Por lo tanto, cabría considerar la hipótesis de que los desplazamientos y migraciones de esta especie estarían restringidos a las interconexiones de los cuerpos de agua (cuencas) y/o de los arenales. Considerando la alta especialización a este tipo de hábitat, se esperaría encontrar una cierta estructuración de las poblaciones en torno a las cuencas que habitan (Capocasale 1990, Costa et al. 2006, Aisenberg et al. 2011b y c, Ghione et al. 2013). Un abordaje de la estructuración espacial de la diversidad genética en esta especie permitirá conocer el grado de conectividad entre diferentes tipos de cuencas y su

relación con eventos poblacionales ocurridos en el pasado. Por otra parte, el género *Allocosa* presenta algunas dificultades en lo que respecta al estatus taxonómico de las especies. Esto estaría relacionado principalmente a la gran simplificación morfológica de las genitales femeninas y masculinas (Dondale 1986, Simó, com. pers.). Por lo tanto, el estudio de la diversidad genética de *A. brasiliensis* podrá aportar información de base para afrontar las dificultades planteadas en la taxonomía del grupo.

Objetivo específico

Analizar la estructuración geográfica de la diversidad genética en las *Allocosa brasiliensis* del sur de Uruguay y zonas cercanas.

Pregunta que busca responder el Capítulo 1

¿Existe estructuración molecular espacial en las cuencas habitadas por *A. brasiliensis*?

Hipótesis y Predicciones

H: *Allocosa brasiliensis* posee una estructuración espacial congruente con las cuencas que habita debido a la alta especialización a los arenales costeros y a los altos costos de establecimiento que tendría el desplazamiento a largas distancias como el *ballooning*.

P: La estructuración genética en el espacio geográfico de *A. brasiliensis* pondrá de manifiesto dichas restricciones en el flujo de individuos de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del muestreo y recolección del material

A efectos de estudiar la estructuración poblacional de *Allocosa brasiliensis* en el sur de Uruguay se consideraron tres de sus principales cuencas hidrográficas: Río Negro - Río Uruguay (cuena 1), Río Santa Lucía (cuena 2) y Laguna Merín (cuena 3) (Servicio Geográfico Militar 2013). Las mismas fueron seleccionadas en base a sus dimensiones, la ocurrencia de eventos geológicos relevantes (tales como variaciones en el nivel del mar) y a la factibilidad logística para llevar a cabo las recolecciones.

Se ubicaron 4 puntos aproximadamente equidistantes sobre las cuencas 1 (1a-d) y 2 (2a-d), y dos puntos sobre la cuena 3 (3a y 3b) (Fig. 1.1, Tabla 1.1). Mediante este diseño, se logra comparar poblaciones de CI y COE dentro de la misma cuena, así como entre diferentes tipos de cuerpos de agua: fluvial, estuarina, lagunar y oceánica. Las mediciones de las distancias a través de las líneas costeras, así como la constatación de características ambientales relevantes para la selección de los sitios se realizaron con Google Earth v7.1.2. Para tener una mejor representatividad en el rango de distribución de la especie se incluyeron especímenes de *A. brasiliensis* de otras localidades de Uruguay (Uru 1-3), Brasil (Bra 1-2) y Argentina (Arg 1-6) (Fig. 1.1, Tabla 1.1). Las localidades Arg 1-5 (Fig. 1.1, Tabla 1.1) se encuentran sobre la cuena del Río Primero, el cual a su vez forma parte de la cuena de Mar Chiquita (Córdoba, Argentina) (Carignano 1999, Mon & Gutiérrez 2009). Esta última consiste en una cuena endorreica ubicada en la Llanura Central Argentina (Carignano 1999, Mon & Gutiérrez 2009). Por lo tanto, la misma se considera un sistema aislado en lo que respecta a la conectividad mediante cuerpos de agua con los restantes sitios de muestreo (Tabla 1.1, Fig. 1.1). Por último, a modo de grupo externo, se incluyeron individuos de *A. alticeps* (Mello-Leitão 1944) provenientes de la localidad 2d de Uruguay y la Arg 7 del sur de Argentina (Fig. 1.1, Tabla 1.1).

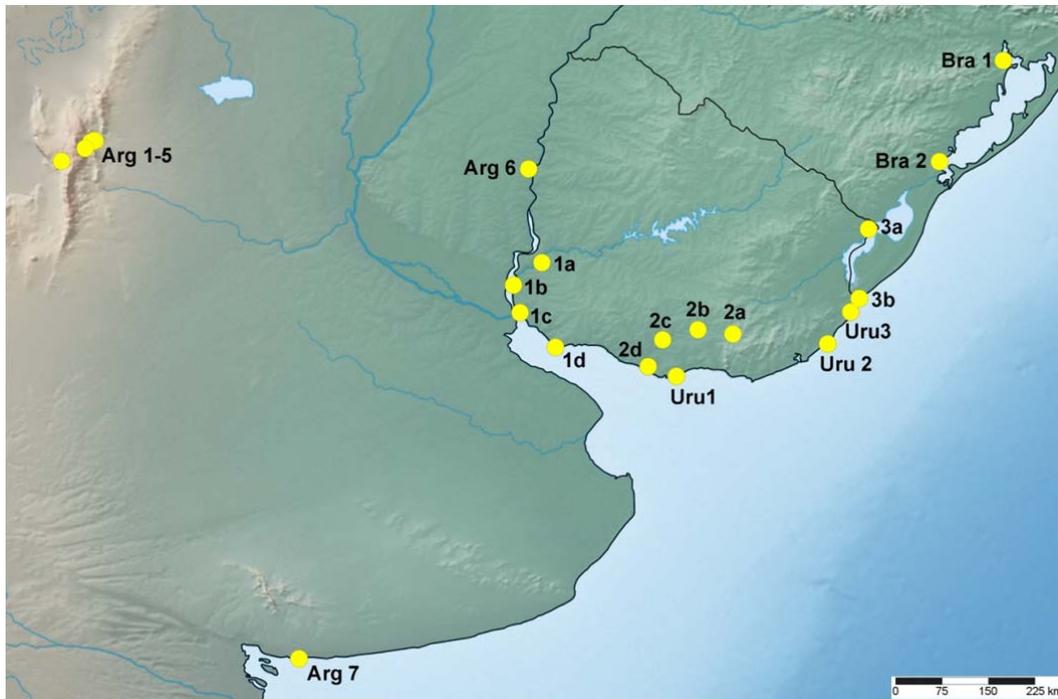


Figura 1.1 – Distribución de las localidades en donde se llevaron a cabo las recolecciones de ejemplares de *Allocosa brasiliensis* y *A. alticeps*. Las localidades 1a-d pertenecen a la Cuenca de los ríos Negro y Uruguay, 2a-d a la Cuenca del Río Santa Lucía y 3a-b a la Cuenca de la Laguna Merín. Uru1-3 corresponden a localidades extra pertenecientes a Uruguay, Bra1 y Bra2 a Brasil y Arg1-6 a Argentina. Los individuos de *A. alticeps* fueron colectados en las localidades 2d y Arg 7.

Las arañas se recolectaron entre diciembre a abril de los años 2011, 2012 y 2013, durante las temporadas reproductivas (noviembre-abril) (Costa et al. 2006). Las capturas se realizaron en horas de la noche, mediante recolección manual con linterna cabezal, logrando detectarlas debido al brillo ocular que presentan los licósidos. En todos los casos se priorizó la captura de individuos adultos, los cuales se sacrificaron en frío a -20°C , se fijaron en etanol al 95% y se mantuvieron a -20°C . En las localidades en donde no se pudo recolectar la totalidad de individuos adultos requerida se recogieron individuos juveniles del mayor tamaño disponible, los cuales se mantuvieron en cautiverio en el Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (LEEE, IIBCE) hasta alcanzar su estado adulto. Los mismos se alimentaron *ad libitum* con larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera, Tenebrionidae) y tuvieron provisión de agua. Una vez llegaron a la adultez, los

individuos se sacrificaron, fijaron y mantuvieron del mismo modo que el material recolectado como adulto. Los ejemplares fueron depositados en la Colección Aracnológica de la Facultad de Ciencias, UdelaR (FCE-AR).

Extracción de ADN, amplificación, secuenciación, alineamiento y obtención de AFLPs

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de una pata de cada individuo y de la utilización del DNeasy Tissue Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad de las mismas fue evaluada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 676 pb del gen mitocondrial que codifica para la Subunidad I de la Citocromo Oxidasa C (de aquí en adelante *cox1*). La presencia del producto de amplificación se evidenció en corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Los detalles de las reacciones de PCR se especifican en el Anexo. Para las mismas se utilizaron los primers C1-J-1490 (Folmer et al. 1994) y C1-N-2191 (Simon et al. 1994).

La diversidad genética se analizó mediante el uso de dos marcadores moleculares de distinto origen: *cox1* y AFLP. En el primero se incluyeron individuos pertenecientes a las localidades de las 3 cuencas en conjunto con otros ejemplares de otros puntos de Uruguay, Brasil y Argentina (Tabla 1.1). A efectos de obtener datos más detallados sobre la estructuración a lo largo de las 3 cuencas estudiadas se utilizaron AFLPs (Tabla 1.1). El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Departament de Biologia Animal de la Universitat de Barcelona, España.

Tabla 1.1 – Localidades de los individuos de *A. brasiliensis* y *A. alticeps* utilizados en este capítulo. La ID refiere el código utilizado en los distintos estudios. Se indica el número de ejemplares utilizados para las distintas técnicas moleculares.

Localidades	ID	Latitud	Longitud	cox1	AFLP	Réplicas AFLP
<i>Allocosa brasiliensis</i>						
Los Arrayanes, Río Negro, Uruguay	1a	-33.2390	-58.0148	5	10	2
La Concordia, Soriano, Uruguay	1b	-33.5659	-58.4284	2	10	2
Zagarzazú, Colonia, Uruguay	1c	-33.9667	-58.3326	1	9	0
Playa Ferrando, Colonia, Uruguay	1d	-34.4714	-57.8174	1	9	2
Paso del Molino, Lavalleja, Uruguay	2a	-34.2780	-55.2339	5	10	3
Fray Marcos, Florida, Uruguay	2b	-34.2160	-55.7421	2	9	4
Paso Pache, Florida, Uruguay	2c	-34.3629	-56.2566	2	9	1
Playa Pascual, San José, Uruguay	2d	-34.7510	-56.4673	2	9	2
Lago Merín, Cerro Largo, Uruguay	3a	-32.7508	-53.2594	2	9	2
Barra del Chuy, Rocha, Uruguay	3b	-33.7613	-53.3925	10	10	3
Carrasco, Montevideo, Uruguay	Uru 1	-34.8927	-56.0568	3	-	-
La Perla, Rocha, Uruguay	Uru 2	-34.4214	-53.8536	3	-	-
Santa Teresa, Rocha, Uruguay	Uru 3	-33.9565	-53.5198	2	-	-
Copina, Córdoba, Argentina	Arg 1	-31.5762	-64.6652	2	-	-
Mayu Sumaj, Córdoba,	Arg 2	-31.4648	-64.5382	1	-	-

Argentina							
Cuesta Blanca, Córdoba, Argentina	Arg 3	-31.4832	-64.5794	1	-	-	
Nono, Córdoba, Argentina	Arg 4	-31.7631	-65.0080	1	-	-	
Villa Independencia, Córdoba, Argentina	Arg 5	-31.4680	-64.5207	1	-	-	
Parque Nacional El Palmar, Entre Rios, Argentina	Arg 6	-31.8761	-58.2087	1	-	-	
Barra do Ribeiro, Ríó Grande do Sul, Brasil	Bra 1	-30.2976	-51.2978	1	-	-	
Pelotas, Ríó Grande do Sul, Brasil	Bra 2	-31.7695	-52.2265	1	-	-	
<i>Allocosa alticeps</i>							
Playa Pascual, San José, Uruguay	2d	-34.7510	-56.4673	6	-	-	
Pehuén-Có, Buenos Aires, Argentina	Arg 7	-39.0042	-61.5512	5	-	-	

A efectos de indagar la existencia de estructuración espacial a nivel específico y poblacional se compararon secuencias del gen mitocondrial *cox1*. Las mismas se obtuvieron a partir de reacciones de PCR sobre ejemplares adultos de *A. brasiliensis* procedentes de las tres cuencas relevadas, en conjunto con material complementario de otras zonas de Uruguay, Brasil y Argentina (Fig. 1.1, Tabla 1.1). Asimismo, y a efectos de contrastar estos resultados con una especie cercana, se utilizaron individuos adultos de *A. alticeps* procedentes de Uruguay (localidad 2d, n=6) y Argentina (localidad Arg 7, n=5), como grupo externo (Tabla 1.1, Fig. 1.1). Este análisis se llevó a cabo con un total de 60 secuencias individuales (Tabla 1.1). La secuenciación se realizó en ambas direcciones, utilizando cada uno de los primers y el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cromatogramas se obtuvieron a través del secuenciador automático ABI 3700 en los Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona

(CCiTUB, www.ccitub.edu). Las secuencias fueron ensambladas y editadas mediante Geneious v.5.3.6. (Drummond et al. 2010) y BioEdit v7.2.5 (Hall 1999). Los haplotipos y el correspondiente listado de individuos de ambas especies de *Allocosa* fueron obtenidos a través del programa DNAsp v5 (Librado & Rozas 2009). Sobre las secuencias de *A. brasiliensis* se realizaron cálculos de diversidad molecular: contenido G+C, diversidad nucleotídica π y diversidad haplotípica H a través del programa DNAsp (Librado & Rozas 2009). En este programa y con el mismo set de datos también se llevaron a cabo análisis de neutralidad: F_s de Fu, D de Tajima y R2, con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Estos análisis ponen a prueba la hipótesis de expansión poblacional reciente y/o selección (Ramos-Onsins & Rozas 2002, Librado & Rozas 2009). Sobre las secuencias de las localidades ubicadas sobre las 3 cuencas (Tabla 1.1, Fig. 1.1) se realizaron cálculos de estructuración poblacional: S_{nn} y F_{st} , a través del programa DNAsp (Hudson et al. 1992, Hudson 2000, Librado & Rozas 2009). Para estos cálculos cada cuenca fue considerada como una población (Tabla 1.1, Fig. 1.1). La red de los haplotipos de las dos especies de *Allocosa* se construyó mediante los programas TCS v1.21 (con un límite del 95%) (Clement et al. 2002) y POPART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) a través del criterio de parsimonia de TCS Network (<http://popart.otago.ac.nz>). Se calcularon valores de divergencia genética de *p-distance* (Nei & Kumar 2000) entre los grupos obtenidos a partir de las redes derivadas de TCS mediante el programa Mega v6 (Tamura et al. 2013). También se estimaron los tiempos de divergencia de los Linajes Evolutivamente Independientes (ver a continuación) implicados en el estudio. Esto se llevó a cabo utilizando el programa BEAST v1.8 (Drummond et al. 2012), el cual permite estimar el tiempo de divergencia de los linajes conjuntamente con la inferencia de sus relaciones filogenéticas en un marco probabilístico Bayesiano. Para llevar a cabo los análisis fue necesario establecer primeramente los parámetros relevantes y, en algunos casos, proporcionar sus valores de probabilidad inicial (*priors*). El modelo evolutivo más idóneo para las secuencias obtenidas se estableció mediante el paquete JMODELTEST v2.1.6, que identificó al modelo Tim3+I como el mejor que explica los datos. Dado que este modelo no está incluido en BEAST y que se trata de una variante del modelo GTR (que sí se incluye) éste último fue el elegido para analizar los datos. BEAST incluye únicamente priors para árboles que representen relaciones entre especies o para poblaciones (modelos de coalescencia), por lo tanto se procedió a identificar

los grupos coalescentes presentes en las secuencias. Para ello se utilizó el método GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*) (Pons et al. 2006, Fontaneto et al. 2007) implementado en el paquete para R SPLITS (*Species Limits by Threshold Statistics*) v1.0-19 (Ezard et al. 2009). El mismo fue ejecutado en RSTUDIO v.0.98.1103 con R v.3.2.0 (R Core Team 2015). El GMYC es capaz de detectar cambios en las tasas de ramificación entre procesos coalescentes (nivel poblacional) y procesos de especiación (cladogénesis), siendo un buen punto de partida para establecer la existencia de Linajes Evolutivamente Independientes de forma objetiva (Posada & Crandall 2001, Pons et al. 2006, Fontaneto et al. 2007). Este análisis está basado en un árbol ultramétrico, por lo cual fue necesario establecer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos y escalar la longitud de las ramas de acuerdo al número de sustituciones acumuladas. El proceso se llevó a cabo en un análisis preliminar utilizando BEAST. Se utilizó un prior para el árbol de tipo coalescente, ya que GMYC aplica el modelo coalescente como hipótesis nula para explicar el patrón de ramificación de los linajes y por tanto representa una opción más conservadora (Monaghan et al. 2009). Una vez identificados los grupos coalescentes se procedió a seleccionar un representante de cada uno de ellos para la estimación de tiempos de divergencia, utilizándose ahora si un prior de árbol de tipo especiación, concretamente el modelo *Yule process*. Se utilizó un reloj molecular relajado de tipo lognormal. Dada la falta de información fósil y de puntos de calibración biogeográficos, se estimó la edad absoluta mediante la incorporación de una tasa (uclid.mean rate) de 0.0199 sustituciones por sitio por millón de años con un desvío de 0.003, la cual fue establecida previamente para el gen *cox1* de arañas de la familia Dysderidae (Bidegaray-Batista & Arnedo 2011). Se realizaron dos cadenas independientes para confirmar la convergencia con longitudes de 10.000.000 de pasos reteniendo datos cada 1000. La mezcla correcta y la convergencia de las cadenas se investigaron con el programa TRACER v.1.6 (Rambaut et al. 2014) y las dos cadenas se combinaron mediante LOGCOMBINER v.1.8.0 (Drummond et al. 2012) y el árbol consenso fue estimado con TREEANNOTATOR v.1.8.0 (Drummond et al. 2012). Las edades obtenidas fueron ubicadas en los distintos períodos a través de la tabla de la International Commission on Stratigraphy (2015).

El estudio de los AFLP consiste en el análisis de los polimorfismos de fragmentos de distinto tamaño generados por enzimas de restricción y sucesivas amplificaciones por PCR.

Dada la diferencia de tamaño con otros genomas celulares, se asume que los loci generados son de origen nuclear. Esta fuente de loci nucleares independientes es particularmente utilizada en organismos no modelo ya que requiere únicamente de la existencia de sitios diana en el ADN para las enzimas de restricción escogidos (Dasmahapatra 2005, Bensch & Åkeson 2005, Meudt & Clarke 2007). Otros aspectos teóricos y metodológicos acerca de la técnica empleada se indican en el Anexo. En términos generales se utilizó la técnica aplicada por Madden et al. (2004), con modificaciones a la originalmente propuesta por Vos et al. (1995). Se analizaron un total de 115 muestras de ADN, de las cuales 94 correspondieron a datos individuales y 21 a réplicas seleccionadas al azar de las mismas extracciones de ADN (22,3 %) para evaluar errores técnicos a través de la reproducibilidad de los loci (Tabla 1.1) (Bonin et al. 2004, Pompanon et al. 2005, Arrigo et al. 2009, Crawford et al. 2012). La digestión del ADN se realizó mediante la acción combinada de las enzimas de restricción TaqI (Sigma) y EcoRI (Sigma). La adición de los adaptadores para cada enzima se llevó a cabo mediante la acción de la enzima T4 DNA ligase (Roche). Posteriormente se continuó con la reacción de preamplificación con los primers correspondientes. Las amplificaciones selectivas se diseñaron para clonar los 4 tipos de fragmentos obtenidos (con extremos TaqI-TaqI, EcoRI- EcoRI, EcoRI-TaqI y TaqI-EcoRI). Cada una de estas reacciones incluyó un primer marcado (Dye). El genotipado por electroforesis capilar se llevó a cabo en los Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB, www.ccitub.edu) mediante GeneMapper (Applied Biosystems). Los electroferogramas fueron editados y visualizados con los programas PEAKSCANNER: v1.0 (Applied Biosystems) y RAWGENO v.2.0 (Arrigo et al. 2009). Este último fue ejecutado dentro de R a través de RSTUDIO v.0.98.1103 con R v.3.2.0 (R Core Team 2015). Los parámetros utilizados en ambos programas siguieron las recomendaciones propuestas en el manual de RAWGENO y las puestas a prueba en Arrigo et al. 2012. Los mismos incluyeron valores de Maxbin = 1.5, Minbin = 1 y una repetibilidad del 98% (logrando maximizar el número de loci retenidos entre 95-99%). Luego de este proceso se obtuvo una matriz con 586 loci, de los cuales 445 fueron polimórficos y se utilizaron en los análisis de AFLPs. Asimismo con este programa se obtuvieron los diagramas de PCoA (Principal Coordinates Analysis) con los porcentajes de varianza explicados por cada uno de los 4 ejes representados. Se llevó a cabo el cálculo de AMOVA (*Analysis of Molecular Variation*), con la

particularidad de que para marcadores binarios implica el cálculo de distancias PhiPT (Φ_{PT}) entre pares de localidades, un análogo del F_{ST} . Para ello, las localidades relevadas fueron consideradas como poblaciones. Los cálculos utilizaron 9999 permutaciones y se realizaron mediante la utilización del paquete para Excel GENALEX v.6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Con estos valores de distancia genética se puso a prueba la hipótesis de aislamiento por distancia a través de un test de Mantel. En el mismo se exploró la posible relación lineal entre los valores calculados de $\Phi_{PT}/(1 - \Phi_{PT})$ para cada par de localidades y el logaritmo natural de las distancias geográficas entre las mismas (Milá et al. 2010, Diniz-Filho et al. 2013). El test de Mantel también fue calculado a través de GENALEX, mediante 9999 permutaciones. Para analizar la influencia de la distancia geográfica en relación a la distancia genética se utilizaron dos criterios: distancias en km. a través de las riberas de los cuerpos de agua implicados y las distancias en línea recta entre los puntos. En ambos casos las medidas fueron tomadas mediante el programa Google Earth v7.1.2. Finalmente, a efectos de establecer de forma objetiva la pertenencia de los individuos a distintas poblaciones se utilizó el programa PRABCLUS implementado en un paquete para R ejecutado a través de RSTUDIO v.0.98.1103 con R v.3.2.0 (Hennig & Hausdorf 2008, Hausdorf & Hennig 2010, R Core Team 2015). El mismo busca maximizar los clusters Gaussianos, a partir de mezclas de distribuciones normales que mejor expliquen la variación de los datos, asignando los individuos a los clusters encontrados, pudiendo también incorporarlos a la categoría ruido (Noise: N). Este método ha sido evaluado de forma comparativa con otros similares como STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) y STRUCTURAMA (Huelsenbeck and Andolfatto 2007) mostrando mejores resultados al momento de utilizar caracteres binarios provenientes de AFLPs (Hausdorf & Hennig 2010). Para el mismo se utilizaron como parámetros preestablecidos valores de $K = 2$ y $r = 4$, ambos obtenidos a partir de las recomendaciones de los autores para mantener el porcentaje de imprecisión de la función de stress por debajo del 20% (final value obtenido = 19.059569).

RESULTADOS

cox1: Diversidad genética, estructuración poblacional e historia demográfica

Las secuencias de ADN de *A. brasiliensis* presentaron una longitud de 676 pb, con un contenido de G+C de 0.306. Incluyeron 21 sitios polimórficos, 19 de los cuales fueron informativos para parsimonia. Su valores de diversidad fueron: diversidad nucleotídica $\pi = 0.00351$ y diversidad haplotípica $H = 0.776$. A partir de las 49 secuencias de *A. brasiliensis* se distinguieron 13 haplotipos. Las 11 secuencias de *A. alticeps* incluyeron 4 haplotipos. Los 17 haplotipos se encuentran representados en la red de la Fig. 1.2. La genealogía obtenida con el programa TCS mostró la existencia 3 redes, agrupando por una parte los haplotipos de *A. brasiliensis*, los de *A. alticeps* de Uruguay y los pertenecientes a *A. alticeps* de Argentina (Fig. 1.2). Los valores de divergencia genética de *p-distance* entre estos 3 grupos se indican en la Tabla 1.2. En la red de haplotipos de *A. brasiliensis* se observa una disposición en forma de estrella, pudiéndose identificar un haplotipo central ampliamente representado (Hap_1, presente en 8 de las 17 localidades relevadas). En torno a éste se disponen los demás haplotipos con escasas diferencias (en el orden de 1 o 2 sustituciones) (Fig. 1.2). El haplotipo central se encuentra presente en sitios distantes, incluso en sitios ubicados sobre cuencas actualmente aisladas como es el caso de las localidades Arg 1 a 5 (Cuenca de Mar Chiquita) con respecto a los demás (Cuenca del Plata, Océano Atlántico) (Tabla 1.1, Fig. 1.1). El resto de los haplotipos muestra una leve estructuración, con algunos vinculados a ciertas localidades o regiones (Hap_2, Hap_4 a 10, Hap_12). Se destaca el Hap_13, representado por dos individuos procedentes de la localidad 3b (Barra del Chuy, Rocha) ya que muestra un alto número de sustituciones de diferencia con respecto al haplotipo central (Fig. 1.2). En cuanto a *A. alticeps*, se observan diferencias pronunciadas entre los ejemplares procedentes de Argentina y Uruguay, representados por los haplotipos 16 y 17 (grupo A) y por los 14 y 15 (grupo B), respectivamente (Fig. 1.2, Tabla 1.2). Entre ambos grupos se destaca el valor más alto de divergencia genética entre los 3 grupos comparados (Tabla 1.2).

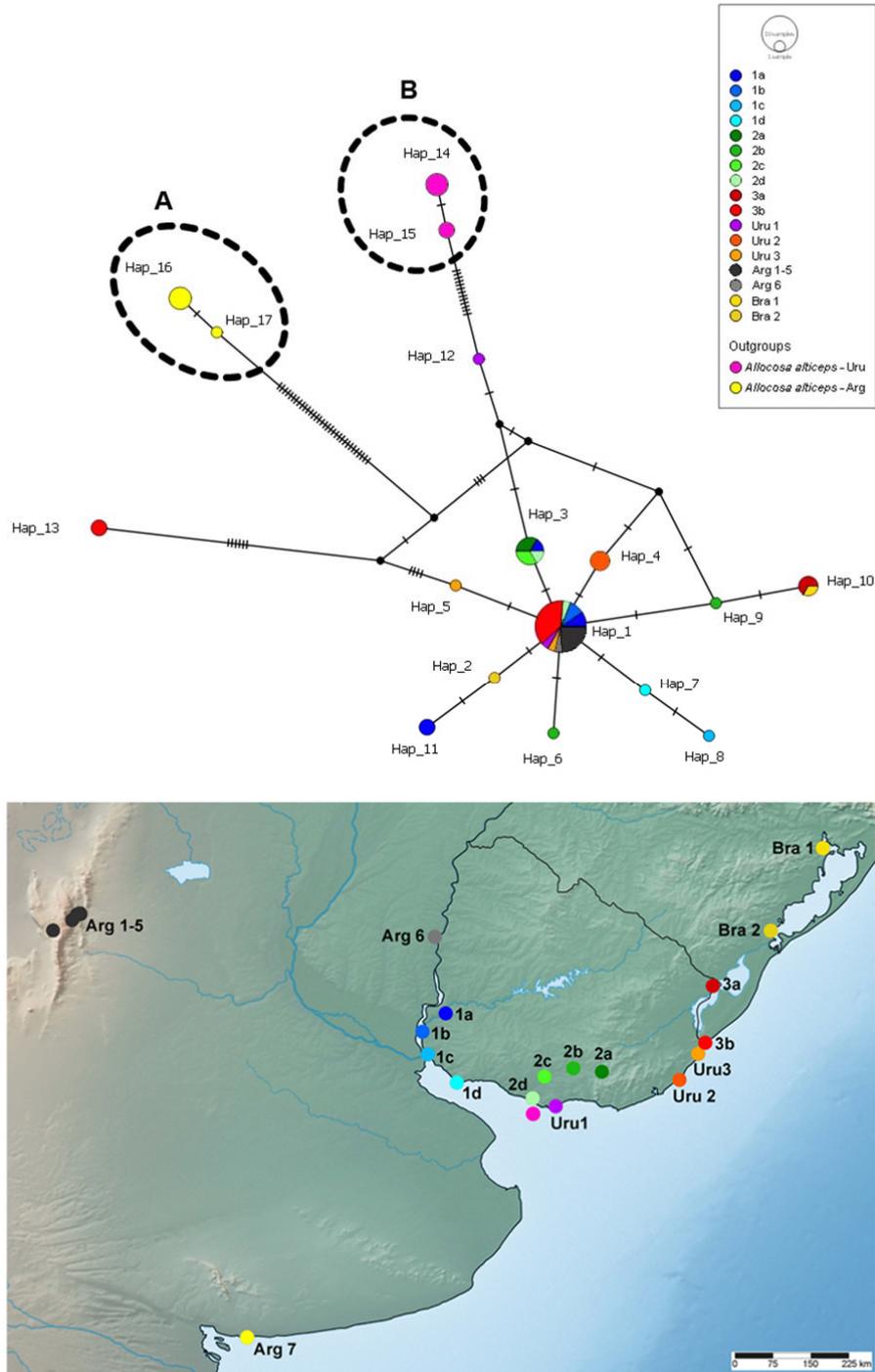


Figura 1.2 – Red de haplotipos en donde se representan las relaciones genealógicas según el criterio de parsimonia de TCS Network. A y B representan dos redes independientes obtenidas en el programa TCS.. Los puntos negros representan ancestros hipotéticos. Las procedencias de los ejemplares dentro de cada haplotipo se representan con distintos colores y se ubican geográficamente en el mapa. Por más detalles sobre las localidades ver Tabla 1.1.

Tabla 1.2 – Divergencia genética (*p-distance*) entre los grupos obtenidos a partir de TCS.

	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. alticeps</i> (Uruguay)
<i>A. alticeps</i> (Uruguay)	0.025	-
<i>A. alticeps</i> (Argentina)	0.057	0.063

Los análisis de estructuración poblacional (S_{nn} y F_{ST}) comparando las 3 cuencas de a pares se muestran en la Tabla 1.3. El estudio de expansión poblacional mostró los siguientes resultados, para un nivel de significación $\alpha = 0.05$: F_s de $F_u = 0,28569$, Tajima $D = -0,03050$ y $R_2 = 0,16010$.

Tabla 1.3 – Comparaciones de S_{nn} y F_{ST} entre pares de cuencas. n.s.: no significativo.

	Snn	Fst
Cuenca 1 vs. Cuenca 2	0,71167 n.s.	0,24745
Cuenca 1 vs. Cuenca 3	0,66189 n.s.	0,09174
Cuenca 2 vs. Cuenca 3	0,83487 n.s.	0,19827

El análisis de GMYC indicó resultados en el límite de significación ($p = 0,053$). Sin embargo, las mismas agrupaciones fueron obtenidas en otros estudios en marcha, al aumentar la representatividad y el número de individuos utilizados (Bidegaray-Batista, com. pers.). Se identificaron 4 Linajes Evolutivamente Independientes, de los cuales 3 contienen más de un haplotipo y el restante contiene solamente uno (singleton) (Fig. 1.3). Se destaca la presencia de este último debido a su longitud, en comparación con las demás *A. brasiliensis*. Este linaje está representado por el haplotipo 13, perteneciente a dos individuos de la localidad 3c (Barra del Chuy, Rocha, Uruguay) (Fig. 1.1, Tabla 1.1). Asimismo se puede observar que los haplotipos de *A. alticeps* procedentes de Argentina (16 y 17) y de Uruguay (14 y 15) formarían dos grupos independientes. Todos estos resultados coinciden con lo constatado a nivel topológico en la red de haplotipos de la Fig. 1.1.

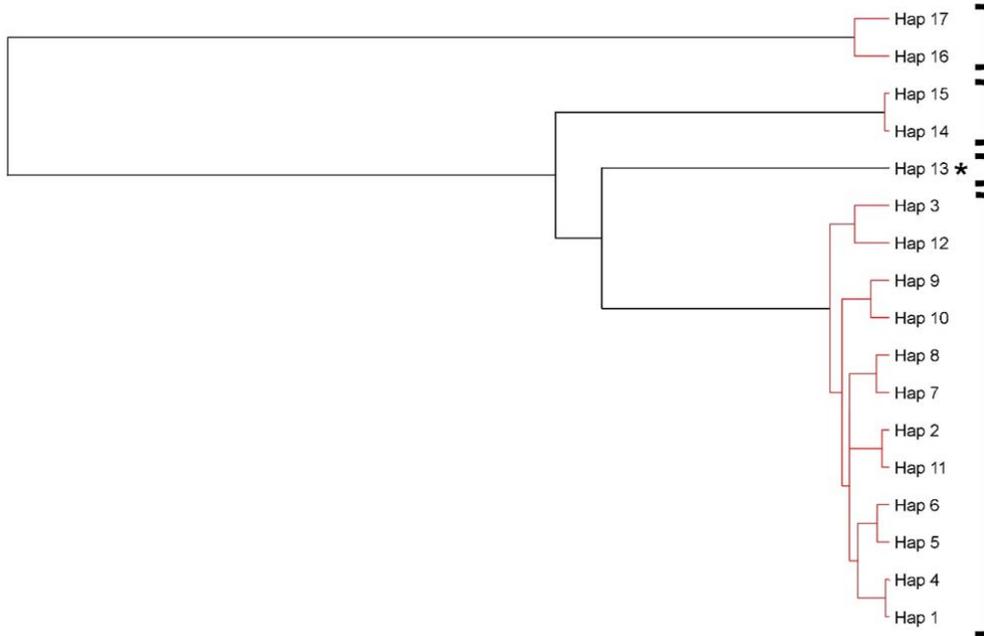


Figura 1.3 – Relaciones filogenéticas por inferencia Bayesiana de los haplotipos. La longitud de las ramas es proporcional al número de cambios. Las llaves delimitan los Linajes Evolutivamente Independientes identificados en GMYC. El asterisco señala el linaje representado por un único haplotipo presente en dos individuos de la localidad 3c.

Las dataciones revelaron que el ancestro común a todos los grupos de *Allocosa* analizados estaría ubicado hace unos 2,13 millones de años (MA), con un intervalo de confianza del 95% entre 0,9 – 3,6 MA (Fig. 1.4). Esta antigüedad estaría situada dentro del Pleistoceno Temprano, cuyo límite inferior se encuentra a 2,58 MA del presente. El ancestro común a *A. brasiliensis* y las *A. alticeps* de Uruguay estaría ubicado hace 0,84 MA (intervalo: 0,35 – 1,44 MA), aproximadamente en el límite entre el Pleistoceno Temprano y el Pleistoceno Medio (Fig. 1.4). A su vez, el ancestro de todas las *A. brasiliensis* analizadas (Figs. 1.2 y 1.3) habría existido hace 0,54 MA (intervalo: 0,18 – 0,98 MA), aproximadamente en el Pleistoceno medio cuyo límite superior se sitúa a 0,13 MA del presente.

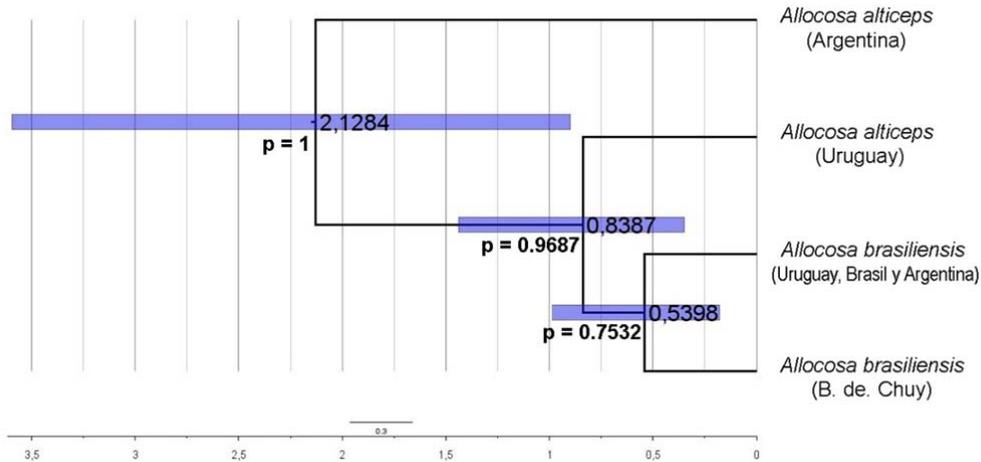


Figura 1.4 – Dataciones estimadas a partir de BEAST de los ancestros comunes más recientes de las Entidades identificadas por GMYC (Fig. 1.3).

AFLPs: Estructuración poblacional en las 3 cuencas

Los resultados de Rawgeno permitieron identificar un total de 586 loci, de los cuales 445 fueron polimórficos y utilizados posteriormente en los análisis. En la Tabla 1.4 se detallan valores de diversidad genética de los AFLPs para las localidades analizadas. Allí se puede destacar la baja cantidad de loci privados (exclusivos de ciertas localidades), al igual que una baja Diversidad en cada localidad. La Fig. 1.5 representa gráficamente los primeros 4 ejes del PCoA (eje 2 vs. eje 1 y eje 4 vs eje 3) con sus respectivos porcentajes de variación explicada, logrando en suma explicar el 16% de la misma. A este nivel no se logra identificar agrupaciones de individuos de acuerdo a la procedencia geografica o a las cuencas Fig. 1.5.

Tabla 1.4 – Descriptores de la diversidad de AFLP en las localidades relevadas. Las bandas refieren a la presencia de un locus. Las bandas privadas son aquellas que se encuentran presentes únicamente en determinada localidad. h : Diversidad, $h = 1 - (p^2 + q^2)$, donde p = Frecuencia de la banda, $q = 1 - p$. Detalles de las localidades en Tabla 1.1.

	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	3a	3b
Nº de bandas	176	170	239	262	118	165	270	212	168	145
Nº de bandas privadas	0	1	5	2	0	0	4	1	0	0
h media	0,102	0,116	0,138	0,185	0,073	0,109	0,170	0,126	0,096	0,082
h SE	0,007	0,008	0,007	0,008	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	0,006

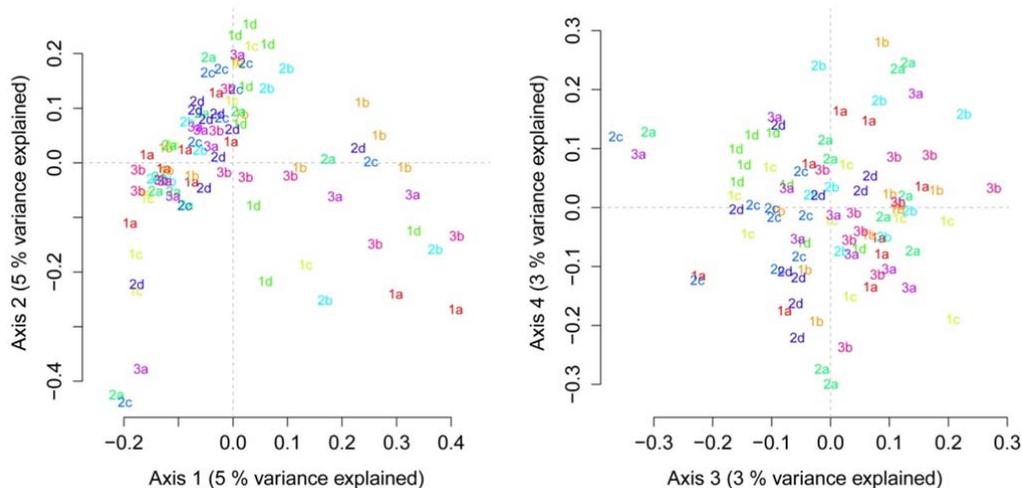


Figura 1.5 – Representación gráfica de los primeros 4 ejes del PCoA: eje 2 vs. eje 1 y eje 4 vs eje 3. En cada eje se indica el porcentaje de variación explicada. En cada punto se indica la localidad de procedencia del individuo. Detalles de las localidades en Tabla 1.1.

Los resultados de AMOVA mostraron un 98% de varianza molecular a nivel intrapoblacional y apenas un 2% a nivel interpoblacional. Se encontraron algunas diferencias

en las comparaciones entre pares de localidades (Tabla 1.4). Se destacan las diferencias encontradas, por ejemplo, entre la localidad 1d y las demás pertenecientes a la cuenca 1 y algunas de la cuenca 2 y 3. También las halladas entre las localidades 2a y las 2c y 2d. Sin embargo no se pueden establecer patrones que sugieran una estructuración en el espacio, por ejemplo a nivel de cuencas. Por su parte, los test de Mantel no apoyaron la hipótesis de aislamiento por distancia. No se encontró una relación lineal entre la matriz de distancias de AMOVA al considerar tanto las distancias entre localidades a través de la costa ($p = 0.196$) como en línea recta ($p = 0.438$).

Tabla 1.5 – Test de AMOVA entre las localidades ubicadas en las 3 cuencas consideradas. Los datos ubicados en la diagonal inferior corresponden a valores de Φ_{PT} , mientras que los de la diagonal superior indican valores de p . Los asteriscos destacan diferencias estadísticamente significativas. Detalles de las localidades en Tabla 1.1.

	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	3a	3b
1a	-	0,089	0,446	0,023*	0,341	0,353	0,436	0,481	0,445	0,435
1b	0,027	-	0,109	0,028*	0,133	0,421	0,076	0,068	0,122	0,258
1c	0,000	0,022	-	0,038*	0,178	0,363	0,404	0,428	0,278	0,230
1d	0,065	0,045	0,038	-	0,004*	0,036*	0,095	0,068	0,093	0,004*
2a	0,007	0,024	0,013	0,093	-	0,176	0,024*	0,014*	0,495	0,260
2b	0,001	0,001	0,002	0,043	0,014	-	0,165	0,437	0,426	0,500
2c	0,001	0,021	0,000	0,019	0,034	0,014	-	0,501	0,464	0,021*
2d	0,000	0,025	0,000	0,032	0,031	0,000	0,000	-	0,479	0,216
3a	0,000	0,021	0,008	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,441
3b	0,000	0,011	0,010	0,076	0,010	0,000	0,032	0,008	0,000	-

El análisis de PRABCLUS no encontró evidencia de que fuera posible asignar individuos a distintos clusters Gaussianos que permitan inferir la presencia de poblaciones (Fig. 1.6). En esta asignación 29 individuos fueron considerados como ruido (noise: “N”) (Fig. 1.6).

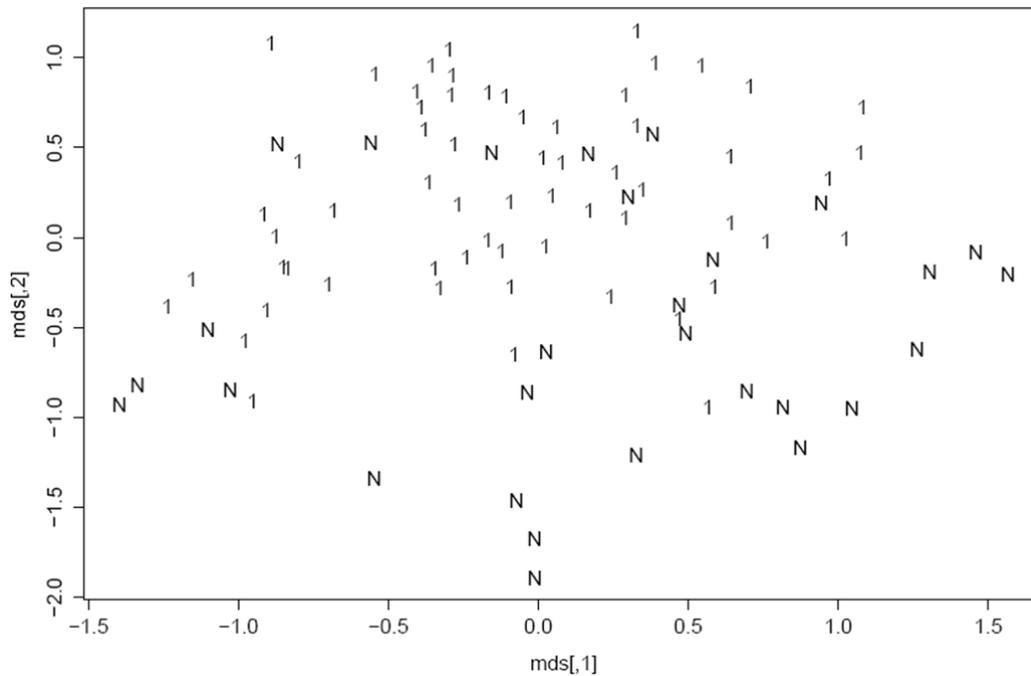


Figura 1.6 – Representación gráfica de asignación de individuos a clusters Gaussianos a partir de PRABCLUS. 1 representa a los individuos designados dentro del cluster 1. N designa a aquellos categorizados como ruido (Noise).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la diversidad molecular basados tanto en el gen mitocondrial *cox1* (red de haplotipos, Snn y F_{ST}) como en los AFLPs (AMOVA) coinciden en que a este nivel no existiría estructuración a nivel espacial. Por lo tanto la hipótesis de estructuración de las poblaciones de acuerdo a las cuencas no estaría soportada. La información genética en su conjunto es coincidente con una hipótesis de expansión poblacional

reciente. Asimismo, las dataciones a partir de las secuencias del gen *cox1* sugieren un origen reciente de *A. brasiliensis*, al igual que los dos grupos de *A. alticeps* analizados.

La escasa estructuración observada en *A. brasiliensis* tanto en el gen *cox1* como en los AFLPs podría estar también vinculada a su alta capacidad de dispersión. Recientemente se ha constatado la presencia de *ballooning* en *A. brasiliensis*, tanto en condiciones de laboratorio como en la naturaleza. Si bien los costos asociados a este tipo de dispersión no han sido evaluados, se ha observado que los juveniles de esta especie podrían realizar vuelos de corta distancia (<2m) (Carlozzi et al. 2014, Postiglioni et al. 2015). Asimismo, recientemente también se ha observado que los adultos y juveniles de *A. brasiliensis* sería capaces de nadar sobre la superficie del agua y bucear (Albín et al. 2015). Esto aumentaría notablemente la capacidad de dispersión de esta especie a lo largo de los cuerpos de agua, particularmente los de agua dulce. En otras especies de arañas lobo de arenales costeros y de ambientes riparios también se han reportado casos de escasa variabilidad a nivel molecular, atribuible a la capacidad de dispersión (Boulton et al. 1998, Bonte et al. 2003, Lambeets et al. 2010). En la especie *Geolycosa pikei* (Marx, 1881) la baja diversidad de alozimas fue relacionada con sucesivos eventos de cuello de botella ocurridos durante la última glaciación y a la capacidad de la especie para dispersarse a través de ballooning (Boulton et al. 1998). Los sucesos de cuello de botella implican una repentina reducción en el tamaño poblacional, lo que puede traer como consecuencia la fijación de variantes alélicas como consecuencia de la deriva génica (Depaulis et al. 2003). En un estudio en la especie de dunas costeras *Pardosa monticola* (Clerck, 1757), también basado en alozimas, se constató una baja diversidad a este nivel, apoyando la hipótesis de cuellos de botella y alta capacidad de dispersión a través de ballooning (Bonte et al. 2003). Más recientemente y mediante la utilización de AFLPs se pudo observar que *Pardosa agricola* (Thorell, 1856) muestra bajos niveles de diferenciación genética a lo largo de un río y ausencia de aislamiento por distancia, sin embargo esta especie no presentaría ballooning (Lambeets et al. 2010). Es relevante destacar que la presencia de este comportamiento también podría estar relacionado con el éxito de sobrevivencia en especies de arañas que habitan ambientes inestables (Greenstone 1982).

Allocosa brasiliensis habría sufrido un proceso de expansión poblacional, el cual estaría fuertemente apoyado por topología en forma de estrella descrita por los haplotipos (Fig. 1.2) y

los análisis de expansión F_s de F_u , Tajima D y R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Asimismo, la ausencia de estructuración observada en los AFLPs sugiere este mismo fenómeno, ya que el equilibrio entre mutación y deriva génica no se habría alcanzado (Slatkin 1993, Depaulis et al. 2003). La expansión poblacional puede implicar tanto un aumento en su distribución como así también en el número de individuos. A su vez, las expansiones pueden estar precedidas de un evento de cuello de botella. Dicho evento es capaz de dejar huellas características en el genoma de los organismos como la reducción de la variabilidad genética producto del efecto acentuado en poblaciones pequeñas de la deriva génica. Por ejemplo, en el caso de los cuellos de botella pronunciados es esperable obtener una genealogía reducida y en forma de estrella (Depaulis et al. 2003). Al mismo tiempo se podrá observar un bajo nivel de variación y un exceso en el número de haplotipos, con respecto al número de mutaciones ocurridas luego del cuello de botella (Depaulis et al. 2003). Estos eventos solamente serían detectables un periodo de tiempo intermedio después de ocurridos (Depaulis et al. 2003). Otra consecuencia probable de este efecto sería también la ubicuidad de un haplotipo, el que podría ser considerado como ancestral, en conjunto con otros haplotipos levemente estructurados y a escasas sustituciones de distancia dado lo reciente del evento (Depaulis et al. 2003). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan fuertemente la ocurrencia de una expansión, precedida de una reducción poblacional o cuello de botella. Este mismo evento ha sido documentado también en *Ctenomys rionegrensis* Langguth y Abella 1970, una especie de roedor fosorial que habita arenas costeros fluviales y oceánico-estuarinos de Uruguay al igual que *A. brasiliensis* (D'Anatro et al. 2011). El Hap_13, distante del haplotipo central por varias sustituciones más que los restantes haplotipos de *A. brasiliensis* podría representar un polimorfismo ancestral (Fig. 1.2). El mismo fue incluso categorizado como un Linaje Evolutivamente Independiente, cuya datación ubica al ancestro común distante en el tiempo (Figs. 1.3 y 1.4). Esta evidencia apoya la hipótesis de una historia compleja a nivel poblacional en *A. brasiliensis*. El Hap_13 podría haber sido heredado en la actualidad por descendientes de individuos que lograron sobrevivir al cuello de botella. Presumiblemente estos sobrevivientes podrían haber quedado aislados del resto lo que les habría permitido acumular sustituciones. La localidad a la que pertenece este haplotipo (3b, Barra del Cuy, Rocha, Uruguay, Tabla 1.1, Fig. 1.1) es una de las que más habría sufrido los efectos de la última y mayor transgresión

marina ocurrida durante el Holoceno. Durante la misma, la región este de Uruguay habría quedado bajo el agua, llegando a cubrir parte del departamento de Rocha (Bracco et al. 2011, 2014, Martínez & Rojas 2006, 2011, 2013, 2014). Es posible que durante este periodo se hayan dado las condiciones para una disminución poblacional de *A. brasiliensis* en esta región, propiciando la formación de relictos temporales aislados. Sin embargo, las diferencias mostradas por el Hap_13 no se vieron reflejadas en los datos proporcionados por los AFLPs, puesto que se utilizaron los mismos individuos. Este hecho podría deberse a las diferencias entre el genoma mitocondrial y el nuclear, principalmente a causa del sesgo materno en la transmisión del ADNmit (Hare 2001, Ballard & Whitlock 2004). Este patrón podría ser causado por un sesgo en la migración de las hembras con respecto a los machos, en donde éstas podrían haber tenido más limitaciones para su dispersión. De haberse dado tales condiciones, el genoma mitocondrial podría haberse mantenido aislado mientras que los machos sí habrían podido dispersar su genoma nuclear en otros sitios. Otra razón para esta discrepancia podría ser causada por la bacteria endosimbionte *Wolbachia*. Se ha visto que en insectos existen incompatibilidades copulatorias diferenciales, siendo menores en los casos en donde la hembra es la infectada (Toews & Brelsford 2012).

En las localidades relevadas, existe una gran representación de un haplotipo del gen *cox 1* de *A. brasiliensis* (Hap_1), que podría ser considerado como un haplotipo ancestral. Dicho haplotipo incluso fue registrado en cuencas actualmente aisladas como la cuenca de Mar Chiquita y la del Plata. El origen de la cuenca de Mar Chiquita se remontaría al Pleistoceno Medio. Este proceso habría sido impulsado por la elevación de las sierras de Córdoba al oeste, la enorme acumulación de sedimento en la desembocadura de los ríos Primero y Segundo hacia el sur y la subida de la altura de San Guillermo al este debido a la actividad tectónica de la Falla de Tostado-Selva (Fig. 1.7) (Kröhling & Iriondo 1999, Mon & Gutiérrez 2009). Todos estos eventos produjeron cambios en el curso de algunos ríos como es el caso del Río Primero, cuenca en donde se ubican las localidades del presente estudio (Tabla 1.1, Figs. 1.1). Este río habría estado conectado con la cuenca del Plata a través de los ríos Salado y Paraná hasta la formación de Mar Chiquita en el Pleistoceno Medio (Fig. 1.7) (Kröhling & Iriondo 1999, Mon & Gutiérrez 2009). De esta manera, el haplotipo ancestral Hap_1 podría haber llegado a los actuales afluentes de Mar Chiquita al igual que a las costas de la cuenca del Plata y al

Océano Atlántico. El ancestro común de *A. brasiliensis* se ubicaría en el Pleistoceno Medio (0.54 MA) (Fig. 1.4), por lo que el marco temporal no sería discordante. Sin embargo, el elevado margen de error obtenido en las dataciones indica que en el futuro será necesario incluir una mayor representatividad tanto de localidades como del número de individuos y de loci analizados. Una evidencia adicional a una conexión pasada entre ambas cuencas también estaría apoyada por la presencia de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *P. kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura) en ambas cuencas (Barrio 1977, Kolenc 2009).

Tampoco se puede descartar el efecto del clima sobre el paisaje, pudiendo generar corredores migratorios propicios para la expansión poblacional de la *A. brasiliensis* en la región, como por ejemplo los arenales. Se cuenta con un importante registro de los cambios climáticos ocurridos durante la última porción del Cuaternario a partir del Pleistoceno Superior (Carignano 1999, Kröhling & Iriondo 1999). Los mismos indican que para la región habrían ocurrido episodios alternados de sequía y humedad, en conjunto con variaciones en la temperatura (Carignano 1999, Kröhling & Iriondo 1999). Los eventos secos y fríos habrían propiciado la formación de amplios arenales, megadunas, como por ejemplo el llamado Mar de Arena Pampeano al sur de Córdoba en el Pleistoceno Superior (Carignano 1999, Kröhling & Iriondo 1999).

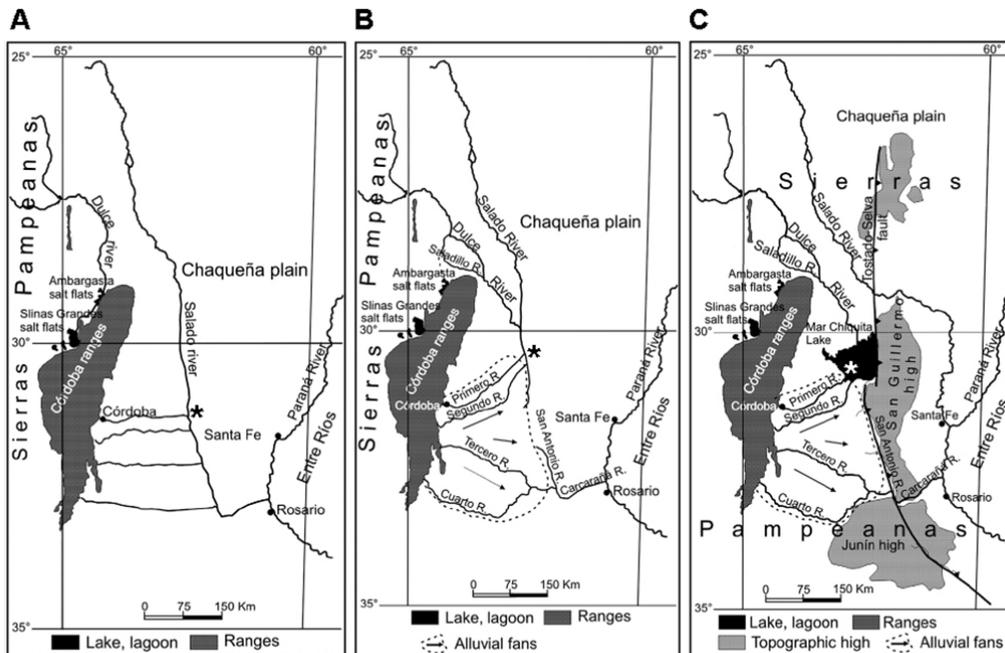


Figura 1.7 – Esquema de la evolución del drenaje de la región de Mar Chiquita. A: Pleistoceno Temprano, el Río Primero desembocaría en el Río Salado. B: Pleistoceno Medio, comienza la acumulación de sedimentos de los ríos Primero y Segundo que llevan a la desconexión con el Río Salado. C: Pleistoceno Medio al presente, los ríos Primero y Segundo migran su recorrido hacia el Noreste desembocando en la Laguna de Mar Chiquita. Los asteriscos indican las desembocaduras del Río Primero. Modificado de Mon & Gutiérrez (2009).

Los patrones genealógicos observados en la red de haplotipos (Fig. 1.2) también podrían deberse a barridas selectivas, las cuales pueden llegar a manifestarse de la misma forma que los eventos demográficos de expansión (Depaulis et al. 2003). Dicha barrida puede ser causada por mutaciones ventajosas que lleven a la fijación del locus en cuestión, o por estar ligado a otro que sí está sometido a este proceso como ocurre en el genoma mitocondrial (Hare 2001, Depaulis et al. 2003, Ballard & Whitlock 2004). Esto podría estar sucediendo de forma directa con el gen *cox1*, cuyo producto se encuentra íntimamente implicado a la respiración celular. Dado que *A. brasiliensis* es una especie fosorial, la función respiratoria podría estar fuertemente seleccionada. Sin embargo, la información obtenida a través de los AFLPs nos permiten descartar esta hipótesis. Estos marcadores no arrojaron resultados

contrastantes con este patrón de ausencia de estructura y escasa heterogeneidad a nivel molecular. La ausencia de aislamiento por distancia revelada por los AFLPs sugiere que esta especie no habría alcanzado el equilibrio entre flujo génico y deriva, lo cual podría deberse a una expansión demográfica (Slatkin 1993). A través de la información brindada por más de un locus independiente y en más de un genoma, es posible inferir con más precisión la historia de una especie. Los procesos a nivel poblacional afectan a todo el organismo por igual, lo cual incluye a todos sus genomas tanto citoplasmáticos como nucleares (Hare 2001, Bidegaray-Batista et al. 2011, Thomson et al. 2010, Brewer et al, 2014).

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos a través de distintos análisis, los ejemplares identificados como *A. alticeps* provenientes de Uruguay, no serían co-específicos con los estudiados de Argentina (Tabla 1.1, Fig. 1.1). Los datos brindados a partir de la red de haplotipos muestran que estos dos grupos estarían separados entre sí y, a su vez, aislados de *A. brasiliensis* (Fig. 1.2). Por su parte, los valores de las distancias genéticas entre los 3 grupos mostraron valores en este mismo sentido (Tabla 1.2). También mostraron el mismo patrón los resultados obtenidos en GMYC, siendo categorizados *A. alticeps* de Uruguay, *A. alticeps* de Argentina y *A. brasiliensis* como Linajes Evolutivamente Independientes (Fig. 1.3). Además se puede observar que las *A. alticeps* de Uruguay estarían filogenéticamente más cercanas a *A. brasiliensis* que las *A. alticeps* de Argentina (Fig. 1.3 y 1.4). Estos hallazgos representan un aporte para próximos abordajes taxonómicos de las especies del género en Sudamérica.

En futuros estudios será necesario implementar el uso de otros marcadores moleculares tales como los SNPs, microsatélites u otro marcador anónimo de origen nuclear que pueda brindar información a nivel poblacional (Thomson et al. 2010, Bidegaray-Batista et al. 2011, Brewer et al. 2014). De esta manera y aumentando las localidades y la cantidad de individuos utilizados se podrá comprender de una forma más acertada la estructuración de las poblaciones en el espacio, al mismo tiempo que aporte información sobre eventos ocurridos en el pasado. Asimismo se deberá analizar de manera individual y detallada la historia de cada localidad, a efectos de comprender los cambios en el paisaje ante las transgresiones marinas, por ejemplo evaluando la presencia o no de arenales. Los esfuerzos de colecta futuros deberán estar dirigidos a localidades sobre la planicie costera del sur de Brasil, ya que esta región comparte su historia reciente con las localidades del este de Uruguay.

Capítulo 2 – Variación morfológica en hembras de *Allocosa brasiliensis* en el sur de Uruguay.

INTRODUCCIÓN

El estudio de caracteres morfológicos en especies con marcada uniformidad somática representa un desafío, particularmente en el reconocimiento de estructuras diagnósticas. La morfometría consiste en la descripción cuantitativa, el análisis y la interpretación de las formas y su variación (Rohlf 1990). La morfometría lineal, aborda la descripción de las formas mediante la cuantificación de distancias entre puntos de relevancia biológica, por ejemplo la longitud máxima de una estructura. A partir de esta información es posible luego realizar comparaciones, por ejemplo entre sexos, especies o localidades, permitiendo proponer hipótesis acerca de las causas ecológicas y evolutivas que puedan dar cuenta de los patrones observados (Zar 2009). En arañas este tipo de herramientas han sido ampliamente utilizadas, tanto en estudios relacionados con la evolución de las genitales (Funke & Huber 2005, Eberhard 2008), como en el análisis del dimorfismo sexual (Framenau 2005, Aisenberg et al. 2007, Aisenberg et al. 2010, Logunov 2011, Foellmer & Moya-Laraño 2007), o las adaptaciones locales (De Busschere et al. 2012), entre otros. En arañas, los enfoques morfométricos han permitido, mediante el estudio de caracteres somáticos y sexuales la distinción de especies cercanas (Pérez-Miles 1988, Milasowszky et al 1998, Simó et al. 2002, Huber et al. 2005, Hepner & Milasowszky 2006, Arnedo et al. 2007, Macías-Hernández et al. 2010).

Allocosa brasiliensis es una araña lobo que habita exclusivamente arenales costeros tanto del Río de la Plata y Océano Atlántico como de ríos, arroyos y lagunas del sur de Brasil, Uruguay y Argentina. Observaciones en la naturaleza, han sugerido que los individuos adultos de *A. brasiliensis* encontrados en arenales costeros del Río de la Plata y Océano Atlántico (COE) muestran algunas diferencias morfológicas (coloración y tamaño) con respecto a adultos de la misma especie correspondientes a arenales de costas de ríos, arroyos y lagunas (CI) (Fig. 1, Introducción General). Los individuos pertenecientes a la COE presentan una coloración amarillenta pálida, con manchas y diseños que varían del castaño rojizo al negro

(Capocasale 1990). Por su parte los correspondientes a CI, al momento poco estudiados, muestran una coloración marcadamente más oscura y presumiblemente tamaños corporales mayores. Los ambientes en donde habitan estos dos morfos también poseen diferencias en cuanto a los factores que podrían suponer distintas presiones selectivas. Las COE son ambientes dinámicos, con amplias variaciones en los regímenes de vientos y oleaje, además de poseer arenales móviles y estar sometida a una constante niebla salina (Defeo et al. 2006). Asimismo, dentro de las COE existiría una amplia variedad de regímenes morfo dinámicos con extremos de playas reflectivas y disipativas. Las playas reflectivas se caracterizan por poseer alta energía y sedimentos de grano grueso. Por el contrario, las playas disipativas poseen una menor energía y sedimentos de grano fino (Defeo et al. 2006). Por su parte, las CI pueden verse afectadas por inundaciones impredecibles a lo largo del año, alcanzando a cubrir amplias superficies de en torno a sus márgenes, incluyendo los arenales en donde habita *A. brasiliensis* (Di Persia & Neiff 1986, Einsele 1992). Observaciones en la naturaleza dan cuenta de que esta especie sería capaz de desplazarse sobre el agua, lo cual representaría una importante ventaja adaptativa a los regímenes de inundaciones en las CI (Costa com. pers). Estudios previos han reportado tamaños corporales mayores en especies de arañas que habitan dunas costeras con arenales dinámicos. Organismos más grandes poseen una menor relación superficie-volumen, por lo que de esta manera minimizarían la pérdida de agua (Bonte et al. 2006). Por otra parte, se ha constatado que adaptaciones morfológicas como un menor tamaño corporal y proporcionalmente patas de mayor longitud serían ventajosos en arañas y chinches de agua con capacidad de desplazarse sobre la superficie del agua (Suter & Gruenwald 2000, Bush & Hu 2006).

Por lo anteriormente expuesto, es posible que las presiones ambientales de distinto tipo hayan moldeado aspectos morfológicos en *A. brasiliensis*, tanto en el tamaño corporal como en en las patas y Pedipalpos. El objetivo de este capítulo es realizar un análisis de la morfología a través de la morfometría lineal en individuos de *A. brasiliensis*, a efectos de analizar si existen diferencias en caracteres continuos somáticos y genitales entre las poblaciones de diferentes tipos de costas. Dada la morfología de las arañas, la morfometría lineal parece ser la que mejor se adecúa al análisis de estructuras que podrían estar bajo el efecto de presiones selectivas de los distintos tipos de ambiente.

Objetivo específico

Comparar la variabilidad morfológica de representantes de *Allocosa brasiliensis* de costas fluviales y costas oceánico-estuarinas.

Pregunta que busca responder el Capítulo 2

¿Existen diferencias morfológicas entre individuos de *A. brasiliensis* pertenecientes a distintos tipos de costa?

Hipótesis y Predicciones

H: *Allocosa brasiliensis* presenta diferencias morfológicas congruentes con las presiones ambientales a las que están sometidas en los dos tipos de costa analizados. Las COE poseen dunas móviles que incrementan la dinámica del ambiente y las CI presentan inundaciones pronunciadas e impredecibles.

P: Estas presiones se verán reflejadas en un tamaño corporal mayor en localidades con COE e individuos más pequeños t con patas proporcionalmente más largas en sitios con CI.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de las diferencias morfológicas entre individuos adultos de *A. brasiliensis* pertenecientes a COE y CI se abordó mediante el análisis comparativo de medidas corporales. El estudio morfométrico fu llevado a cabo solamente con hembras adultas debido a su mayor disponibilidad en las capturas manuales (Costa et al. 2006).

Se seleccionaron localidades representativas de las cuencas de los ríos Negro-Uruguay, del río Santa Lucía y de la Laguna Merín (Tabla 2.1) (Servicio Geográfico Militar 2013). Las mismas fueron seleccionadas debido a sus dimensiones, la presencia en el pasado reciente de eventos geológicos relevantes y por la factibilidad para llevar a cabo los muestreos

(Servicio Geográfico Militar 2013). La ubicación de los puntos se planificó maximizando la representación de los distintos tipos de costas en los que estas arañas habitan. Las localidades sobre las cuencas de ríos incluyen costas estrictamente fluviales y también estuarinas (próximos a su desembocadura en el río de la Plata) (Fig. 2.1, Tabla 2.1). La localidad de la cuenca de la Laguna Merín (Barra del Chuy) representa una costa de tipo oceánica. Si bien en la actualidad esta zona no está ligada a esta cuenca, durante el Holoceno sí lo estuvo (Del Puerto et al. 2013, Panario & Gutiérrez 2011).

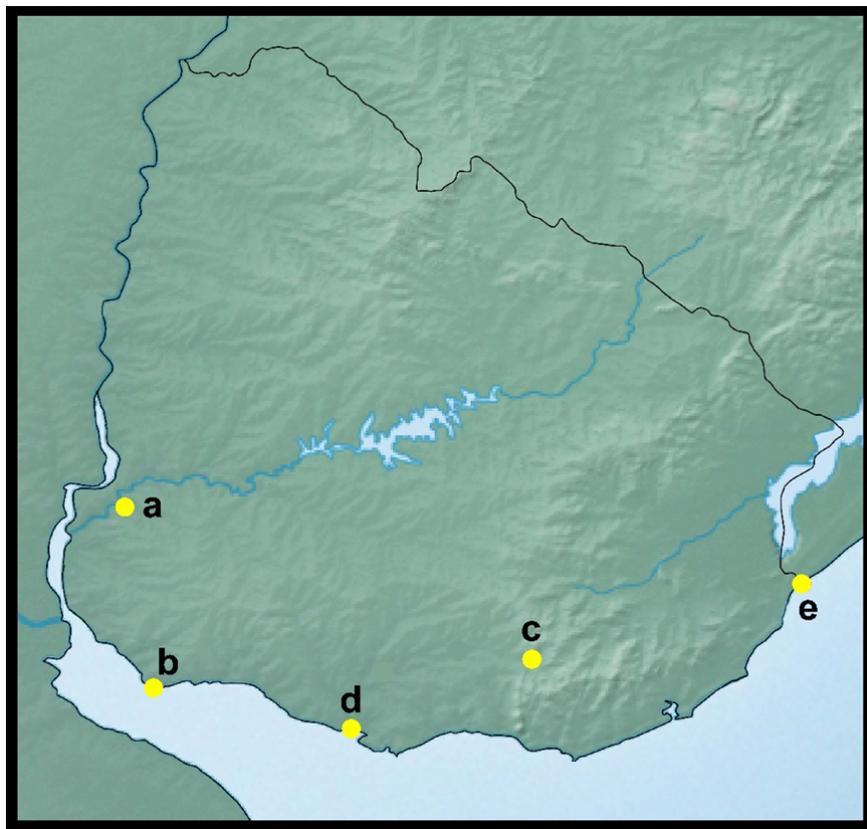


Figura 2.1 – Localidades de procedencia del material analizado. a: Los Arrayanes, Río Negro, Uruguay (CI), b: Playa Ferrando, Colonia, Uruguay (COE), c: Paso del Molino, Lavalleja, Uruguay (CI), d: Playa Pascual, San José, Uruguay (COE), e: Barra del Chuy, Rocha, Uruguay (COE).

Los individuos fueron recolectados entre los meses de noviembre y abril, período de mayor actividad reproductiva de la especie (Costa et al. 2006) en los años 2011, 2012 y 2013.

Las capturas se llevaron a cabo manualmente durante la noche, por medio de linterna de cabeza que permite reconocer el brillo del tapetum ocular. En las localidades de Los Arrayanes (Río Negro, Uruguay) y Paso del Molino (Lavalleja, Uruguay) no fue posible alcanzar el número de hembras mínimo de 20. Por lo tanto se recolectaron juveniles del mayor tamaño posible para su posterior cría en el LEEE, IIBCE hasta alcanzar su adultez ($n = 3$ y $n = 7$, respectivamente). Los individuos se alimentaron *ad libitum* con larvas de *Tenebrio molitor* (Linneaus) (Coleoptera, Tenebrionidae) y fueron provistos con agua. Todos los individuos se sacrificaron en frío a -20°C y se mantuvieron en Etanol al 75% a temperatura ambiente. Los ejemplares fueron depositados en la Colección Aracnológica de la Facultad de Ciencias, UdelaR (FCE-AR).

Tabla 2.1 – Localidades en donde se recolectó el material para el análisis morfológico especificando las coordenadas de cada sitio, así como la cantidad ejemplares analizados y el tipo de costa.

Localidades	Latitud	Longitud	# individuos	Tipo de costa
Los Arrayanes, Río Negro, Uruguay	-33.239008	-58.014822	21	CI
Playa Ferrando, Colonia, Uruguay	-34.471390	-57.817439	20	COE
Paso del Molino, Lavalleja, Uruguay	-34.277984	-55.233923	20	CI
Playa Pascual, San José, Uruguay	-34.750966	-56.467265	20	COE
Barra del Chuy, Rocha, Uruguay	-33.761308	-53.392495	19	COE

Las medidas corporales se tomaron sobre al menos 19 individuos de cada localidad (Tabla 2.1). Se midió el ancho del cefalotórax, las longitudes del Fémur y el segmento Patela-Tibia de Pedipalpos, Patas I y Patas II (Fig. 2.2). El ancho de cefalotórax es un parámetro ampliamente utilizado en arañas para evaluar el tamaño corporal (Foellmer & Fairbairn 2005, Foellmer & Moya-Laraño 2007, Aisenberg et al. 2010). Para el caso de los Pedipalpos y Patas,

la medida del segmento Patela-Tibia ha sido utilizado como indicador de la longitud del apéndice (Foellmer & Fairbairn 2005, Aisenberg et al. 2010). Las mediciones se realizaron con micrómetro ocular, mediante lupa estereoscópica (aumento de 0.7 – 4.5x, apreciación 0.15 – 0.02 mm, respectivamente). La fiabilidad de las medidas fue evaluada mediante un test de repetibilidad (ANOVA de Medidas Repetidas) mediante la selección de 10 individuos al azar, los cuales fueron medidos independientemente en 3 oportunidades ($n = 10$, $k = 3$) (Foellmer & Fairbairn 2005, Aisenberg et al. 2010). No se encontraron diferencias significativas entre las réplicas de las repeticiones ($F_{2,29} = 0.52$, $p = 0.949$), por lo que dichas mediciones son consideradas confiables.

Los datos se transformaron mediante logaritmo neperiano, a efectos de uniformizar las escalas en las que las variables fueron registradas. Salvo excepciones indicadas, se utilizó el criterio de clasificación por localidades para las comparaciones de las variables analizadas. Esto se debió a que otros modos de agrupación, tales como el tipo de costa o las cuencas, no siempre cumplieron con los supuestos de los análisis como la homogeneidad de varianzas o la normalidad en la distribución de los datos.

Se realizaron comparaciones globales de las medidas de ancho de cefalotórax, interdistancias, ancho y altura de los orificios copulatorios. En los casos en donde estos datos cumplieron con los supuestos dichas comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía y posteriores comparaciones de a pares a través del test de Tukey. En el caso de no cumplir con los mismos las comparaciones se llevaron a cabo a través del test de Kruskal-Wallis, con comparaciones entre pares mediante el test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. A consecuencia de las diferencias en el tamaño corporal, las variables morfométricas también se compararon mediante análisis que permitieran eliminar el efecto de tales diferencias. Esto se llevó a cabo mediante el test de ANCOVA de una vía, con posteriores comparaciones entre pares a través de sus medias marginales (corregidas por la covariable) con correcciones de Bonferroni. Previo a la realización de todos los análisis paramétricos se evaluaron los siguientes supuestos: normalidad de la distribución las variables a través del test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. En los análisis en donde estuvo implicada una covariable, la relación lineal entre la variable y la covariable se evaluó mediante regresiones lineales. Para el caso de los orificios copulatorios

esta relación no se cumplió y las comparaciones se llevaron a cabo mediante el cálculo individual de un índice entre la variable y el ancho del cefalotórax, de manera de corregir por el tamaño corporal. Se realizó un análisis de componentes principales a efectos de evaluar la variación morfológica en su conjunto. Con el fin de minimizar las diferencias constatadas de los tamaños corporales, para este análisis se utilizaron todas las variables morfométricas con excepción del ancho del cefalotórax. Los análisis morfométricos se llevaron a cabo mediante los programas Past v.3.01 (Hammer et al. 2001), Statistica 8.0 y el paquete estadístico R v.3.1.2 (R Core Team 2014).

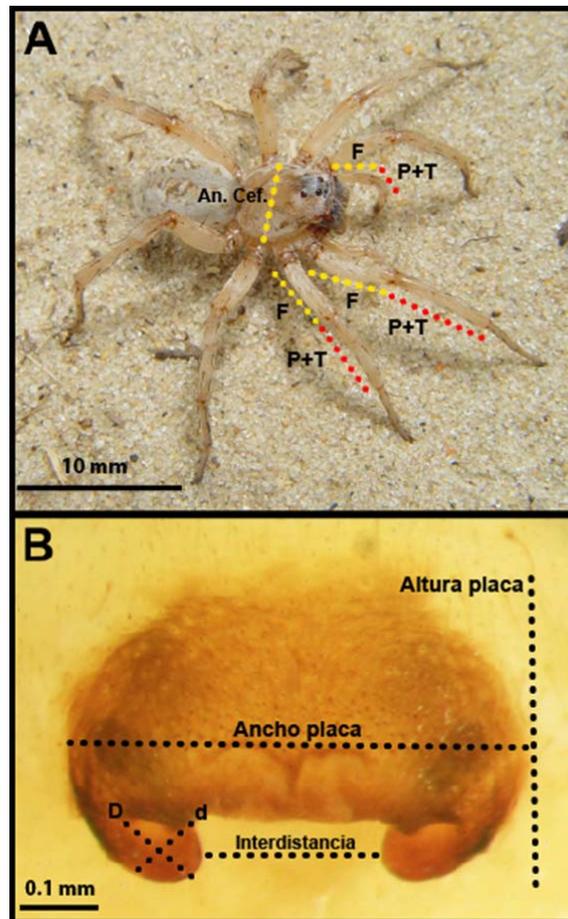


Figura 2.2 – Estructuras corporales somáticas (A) y genitales (B) registradas sobre hembras adultas de *Allocosa brasiliensis*. A: F = Fémur, P+T= segmento Patela-Tibia, An. Cef.= ancho de Cefalotórax. B: placa= placa del epigino, D= diámetro mayor del orificio copulatorio, d= diámetro menor del orificio copulatorio.

RESULTADOS

El ancho de cefalotórax mostró diferencias significativas al considerar los individuos pertenecientes a las distintas localidades (ANOVA, $F_{4,99} = 42.65$, $p < 0.0001$) (Fig. 2.3 A, Tabla 2.2). Las hembras pertenecientes a Barra del Chuy presentaron el menor tamaño corporal. A estas les sigue en orden creciente las pertenecientes a Los Arrayanes, Paso del Molino y por último Playa Ferrando y Playa Pascual sin diferencias entre sí (Tabla 2.3). Las diferencias en tamaño también condujeron a considerar la localidad oceánica (Barra del Chuy) como un grupo aparte. De esta manera, las comparaciones planteadas para el objetivo del presente capítulo debieron ser modificadas, teniendo en cuenta ahora 3 tipos de costa: Fluvial, Estuarina y Oceánica. Las comparaciones globales de los anchos de cefalotórax de acuerdo a este criterio mostraron diferencias significativas (ANOVA, $F_{2,99} = 73.59$, $p < 0.0001$) (Fig. 2.3 B). Las comparaciones entre pares se detallan en la Tabla 2.4. Allí se puede observar que los individuos de menor tamaño son los pertenecientes a costa Oceánica, seguido por los de costa Fluvial y Estuarina, en orden creciente (Fig. 2.3 B).

Tabla 2.2 - Medias y desvíos estándar ($\bar{x} \pm SD$) de las variables morfométricas registradas. Medidas somáticas (parte superior) y genitales (parte inferior) expresadas en mm. Para los apéndices: F = Fémur, P+T = segmento Patela-Tibia. Para el epigino: placa= placa del epigino, D= diámetro mayor del orificio copulatorio, d= diámetro menor del orificio copulatorio. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Los Arrayanes	Playa Ferrando	Paso del Molino	Playa Pascual	Barra del Chuy
Ancho cefalotórax	4.66 ± 0.36	5.74 ± 0.6	5.18 ± 0.66	5.92 ± 0.66	3.98 ± 0.33
Pedipalpos (F)	2.79 ± 0.27	3.43 ± 0.36	2.97 ± 0.41	3.49 ± 0.38	2.5 ± 0.22
Pedipalpos (P+T)	3.15 ± 0.37	3.98 ± 0.58	3.37 ± 0.46	3.9 ± 0.52	2.62 ± 0.25
Patas I (F)	5.11 ± 0.5	6.23 ± 0.67	5.38 ± 0.84	6.16 ± 0.74	4.26 ± 0.4
Patas I (P+T)	6.68 ± 0.69	8.05 ± 0.8	7 ± 1.06	7.89 ± 0.97	5.25 ± 0.47
Patas II (F)	4.83 ± 0.51	5.87 ± 0.63	5.23 ± 0.73	5.77 ± 0.64	4.04 ± 0.34
Patas II (P+T)	6.19 ± 0.68	7.42 ± 0.82	6.58 ± 1.03	7.24 ± 0.89	4.89 ± 0.43
Ancho placa	0.76 ± 0.07	0.86 ± 0.09	0.81 ± 0.11	0.92 ± 0.1	0.71 ± 0.06
Alto placa	0.63 ± 0.06	0.66 ± 0.09	0.65 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.57 ± 0.06
Interdistancia	0.29 ± 0.04	0.32 ± 0.06	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.24 ± 0.03
D	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02
d	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01

Tabla 2.3 - Comparaciones entre pares de localidades mediante test de Tukey (ANOVA *post hoc*) de las medidas de ancho de cefalotórax. En la diagonal superior se muestran valores de p. En la diagonal inferior se muestran valores de Q. Los asteriscos indican diferencias significativas. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Los Arrayanes	Playa Ferrando	Paso del Molino	Playa Pascual	Barra del Chuy
Los Arrayanes	-	p<0.001*	0,030*	p<0.001*	0,001*
Playa Ferrando	8,94	-	0,010*	0,838	p<0.001*
Paso del Molino	4,29	4,65	-	p<0.001*	p<0.001*
Playa Pascual	10,41	1,47	6,12	-	p<0.001*
Barra del Chuy	5,66	14,6	9,95	16,07	-

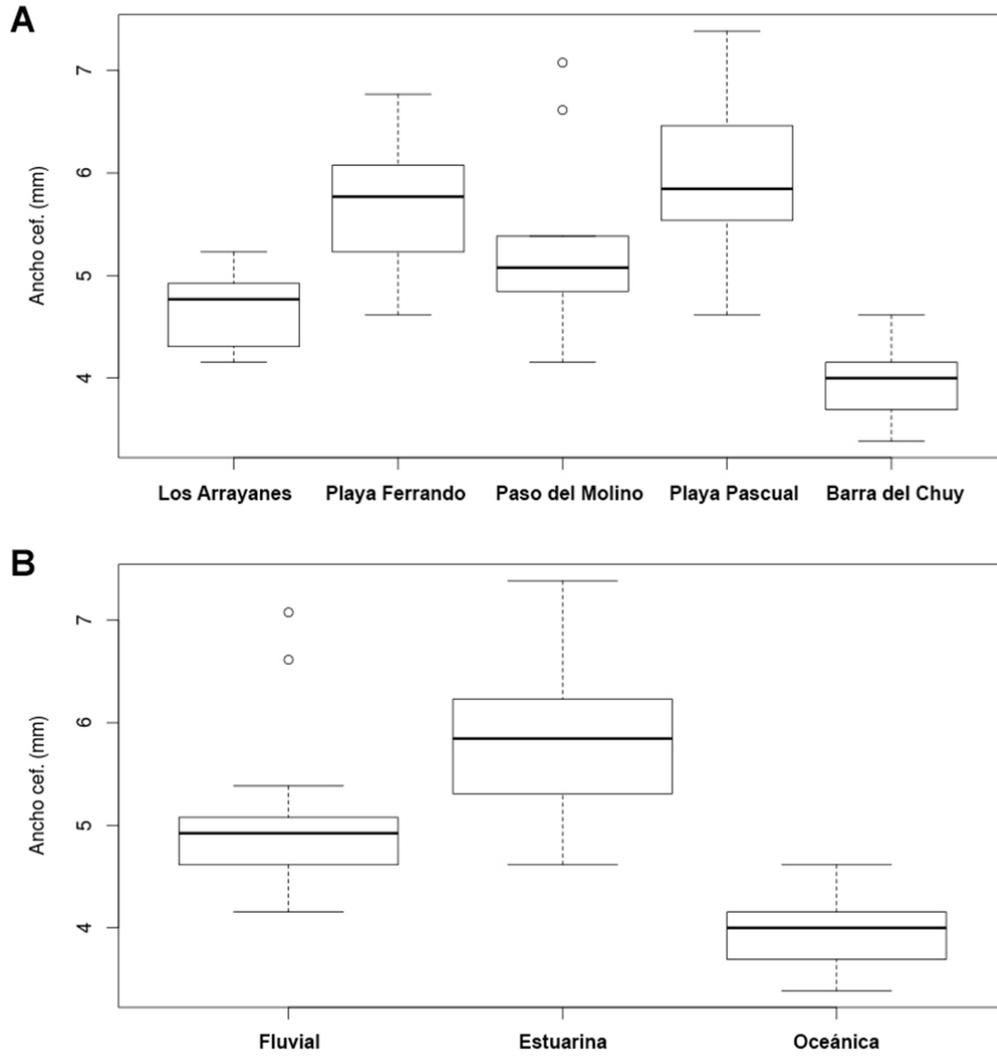


Figura 2.3 – Boxplot de las medidas de ancho de cefalotórax. A: Considerando a los individuos según su localidad. B: Teniendo en cuenta el tipo de costa en la que habitan. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

Tabla 2.4 – Comparaciones de ancho de cefalotórax entre pares para individuos pertenecientes a diferentes tipos de mediante test de Tukey (ANOVA *post hoc*). En la diagonal superior se muestran valores de p. En la diagonal inferior se muestran valores de Q. Los asteriscos indican diferencias significativas.

	Fluvial	Estuarina	Oceánica
Fluvial	-	p<0.001*	p<0.001*
Estuarina	8,82	-	p<0.001*
Oceánica	9,02	17,84	-

Los Pedipalpos también mostraron diferencias significativas en las dos variables registradas al comparar los individuos pertenecientes a las distintas localidades y excluyendo el efecto de las diferencias debidas al tamaño corporal (Fig. 2.4). Para las medidas de Fémur: ANCOVA, $F_{4,99} = 7.73$, $p < 0.0001$, y en el segmento Patela-Tibia: ANCOVA, $F_{4,99} = 3.55$, $p = 0.01$. Dentro de las comparaciones de a pares se destaca que los Fémures de los individuos de Barra del Chuy fueron significativamente mayores a los de Los Arrayanes y Paso del Molino, y con la misma tendencia pero en el límite de significación con respecto a los de Playa Pascual. Los pertenecientes a Playa Ferrando mostraron ser mayores que los de Paso del Molino (Tabla 2.5, Fig. 2.4 A). Por otra parte, a pesar de que los segmentos Patela-Tibia mostraron diferencias a nivel global, las mismas no pueden ser detectadas al comparar entre pares de localidades (Tabla 2.5, Fig. 2.4 B).

Tabla 2.5 – Comparaciones de medidas de Pedipalpos entre pares de localidades a través de sus medias marginales con corrección de Bonferroni (ANCOVA *post hoc*). Los valores indican resultados de probabilidades. Los asteriscos destacan diferencias significativas entre los grupos. F = Fémur, P+T = segmento Patela-Tibia. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	F	P+T	F	P+T	F	P+T	F	P+T
Los Arrayanes	1	1	0.055	0.143	1	0.371	0.019*	1
Playa Ferrando	-	-	0.037*	0.094	1	0.061	0.155	1
Paso del Molino	-	-	-	-	0.386	1	<0.001*	1
Playa Pascual	-	-	-	-	-	-	0.053	1

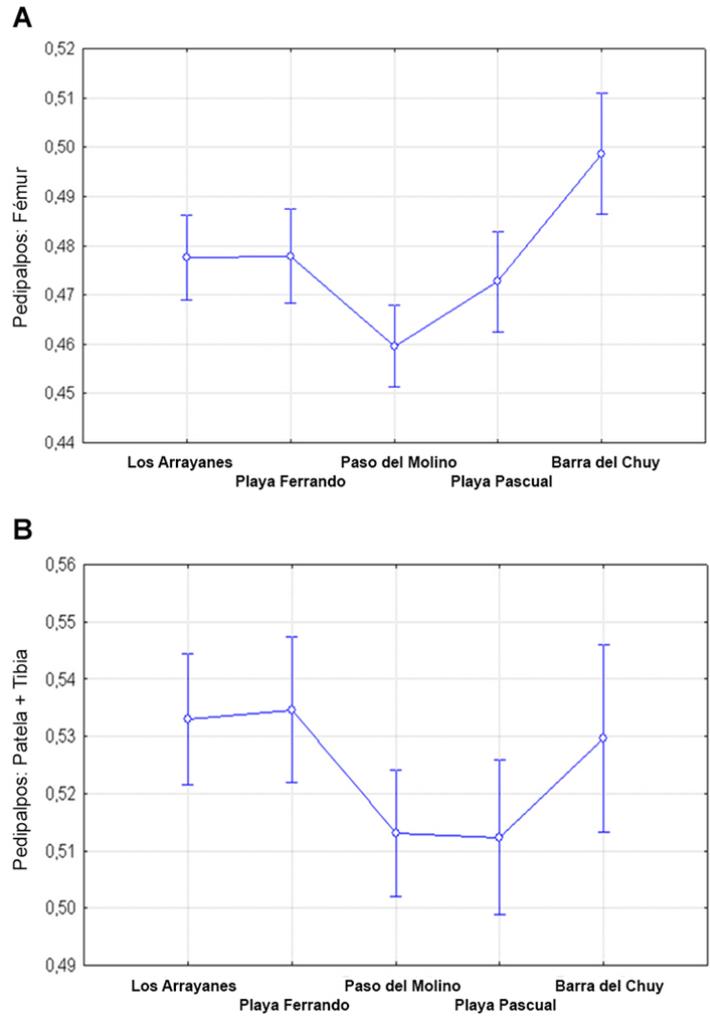


Figura 2.4 – Medias corregidas por tamaño corporal y sus desvíos estándar a partir de las comparaciones de ANCOVA de Fémures (A) y segmentos Patela-Tibia (B) de Pedipalpos en individuos de diferentes localidades. Detalles de las mismas en Tabla 2.1.

Las comparaciones globales de Fémures y segmentos Patela-Tibia de las Patas I mostraron diferencias significativas, ANCOVA: Fémures: $F_{4,99} = 5.06$, $p = 0.001$, segmento Patela-Tibia: $F_{4,99} = 8.67$, $p < 0.0001$ (Fig. 2.5). Analizando entre pares de localidades, se observa que los Fémures de Los Arrayanes serían más largos que los de Paso del Molino y Playa Pascual (Tabla 2.6, Fig. 2.5 A). Los segmentos Patela-Tibia pertenecientes a individuos de Los Arrayanes mostraron ser de mayor tamaño que los de Paso del Molino, Playa Pascual y

Barra del Chuy. Por su parte, los de Playa Ferrando mostraron ser mayores que los de Paso del Molino (Tabla 2.6, Fig. 2.5 B).

Tabla 2.6 – Comparaciones de medidas de Patas I entre pares de localidades a través de sus medias marginales con corrección de Bonferroni (ANCOVA *post hoc*). Los valores indican resultados de probabilidades. Los asteriscos destacan diferencias significativas entre los grupos. F = Fémur, P+T = segmento Patela-Tibia. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	F	P+T	F	P+T	F	P+T	F	P+T
Los Arrayanes	1	1	0,005*	0,005*	0,017*	0,002*	1	0,002*
Playa Ferrando	-	-	0,19	0,407	0,086	0,022*	1	0,52
Paso del Molino	-	-	-	-	1	1	0,437	1
Playa Pascual	-	-	-	-	-	-	0,78	1

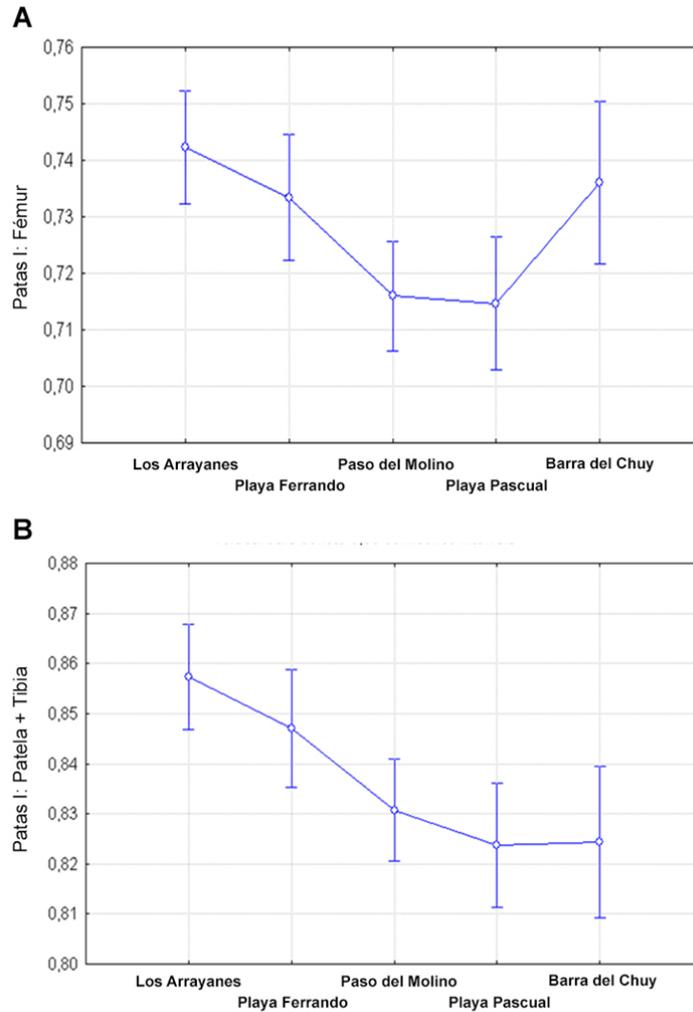


Figura 2.5 – Medias corregidas por tamaño corporal y sus desvíos estándar a partir de las comparaciones de ANCOVA de Fémures (A) y segmentos Patela-Tibia (B) de Patas I en individuos de diferentes localidades. Detalles de las mismas en Tabla 2.1.

Los análisis en Patas II mostraron de igual forma diferencias globales en las comparaciones de Fémures y segmentos Patela-Tibia entre localidades. ANCOVA: Fémures, $F_{4,99} = 3.72$, $p = 0.007$; Patela-Tibia, $F_{4,99} = 8.67$, $p < 0.0001$ (Fig. 2.6). En las comparaciones de a pares se advierte que los Fémures de las hembras de Playa Pascual son menores que los de Los Arrayanes y Playa Ferrando (sin diferencias entre estos dos últimos) (Tabla 2.7, Fig. 2.6 A). En los segmentos Patela-Tibia se observó un mayor tamaño en los individuos pertenecientes a

Los Arrayanes con respecto a los de Paso del Molino, Playa Pascual y Barra del Chuy (sin diferencias entre estos 3 últimos). A su vez, este segmento mostró ser más largo en los ejemplares de Playa Ferrando con respecto a los de Playa Pascual (Tabla 2.7, Fig. 2.6 B).

Tabla 2.7 – Comparaciones de medidas de Patas II entre pares de localidades a través de sus medias marginales con corrección de Bonferroni (ANCOVA *post hoc*). Los valores indican resultados de probabilidades. Los asteriscos destacan diferencias significativas entre los grupos. F = Fémur, P+T = segmento Patela-Tibia. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	F	P+T	F	P+T	F	P+T	F	P+T
Los Arrayanes	1	0,248	0,956	0,024*	0,024*	<0,001*	1	0,017*
Playa Ferrando	-	-	1	1	0,031*	0,008*	1	1
Paso del Molino	-	-	-	-	0,517	0,141	1	1
Playa Pascual	-	-	-	-	-	-	1	1

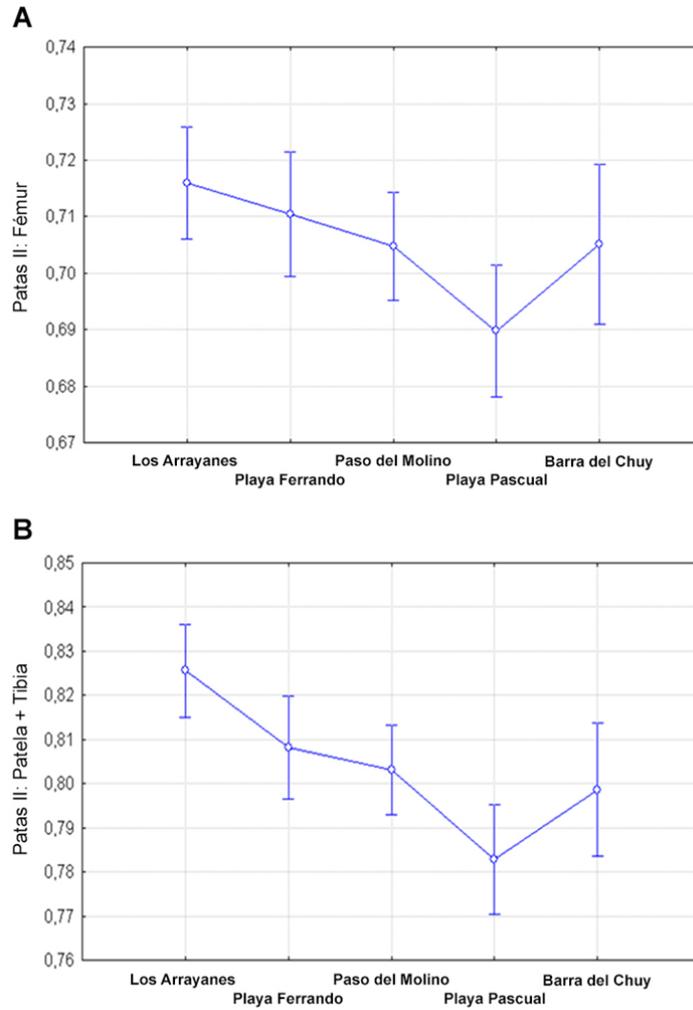


Figura 2.6 – Medias corregidas por tamaño corporal y sus desvíos estándar a partir de las comparaciones de ANCOVA de Fémures (A) y segmentos Patela-Tibia (B) de Patas II en individuos de diferentes localidades. Detalles de las mismas en Tabla 2.1.

Las comparaciones de ANCOVA para las medidas tomadas en epiginos mostraron diferencias tanto en el ancho ($F_{4,99} = 4.21$, $p = 0.004$) como en la altura de la placa del epigino ($F_{4,99} = 4.07$, $p = 0.004$) (Fig. 2.7, medidas absolutas en Tabla 2.2). De las comparaciones entre pares de localidades se observó que los epiginos de Barra del Chuy mostraron un ancho mayor a los de Playa Ferrando y Paso del Molino (sin diferencias entre estos dos últimos) (Tabla 2.8 Fig. 2.7 A). Asimismo los pertenecientes a individuos de Los Arrayanes y Barra del Chuy

mostraron una altura mayor a los de Playa Ferrando y Playa Pascual (sin encontrar diferencias entre los primeros ni entre los últimos) (Tabla 2.8, Fig. 2.7 B).

Tabla 2.8 – Comparaciones de ancho y altura de epiginos entre pares de localidades a través de sus medias marginales con corrección de Bonferroni (ANCOVA *post hoc*). Los valores indican resultados de probabilidades. Los asteriscos destacan diferencias significativas entre los grupos. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	Ancho	Alto	Ancho	Alto	Ancho	Alto	Ancho	Alto
Los Arrayanes	1	0,01*	1	0,639	1	0,024*	0,088	1
Playa Ferrando	-	-	1	0,487	0,23	1	0,034*	0,012*
Paso del Molino	-	-	-	-	1	0,801	0,037*	0,163
Playa Pascual	-	-	-	-	-	-	0,956	0,024*

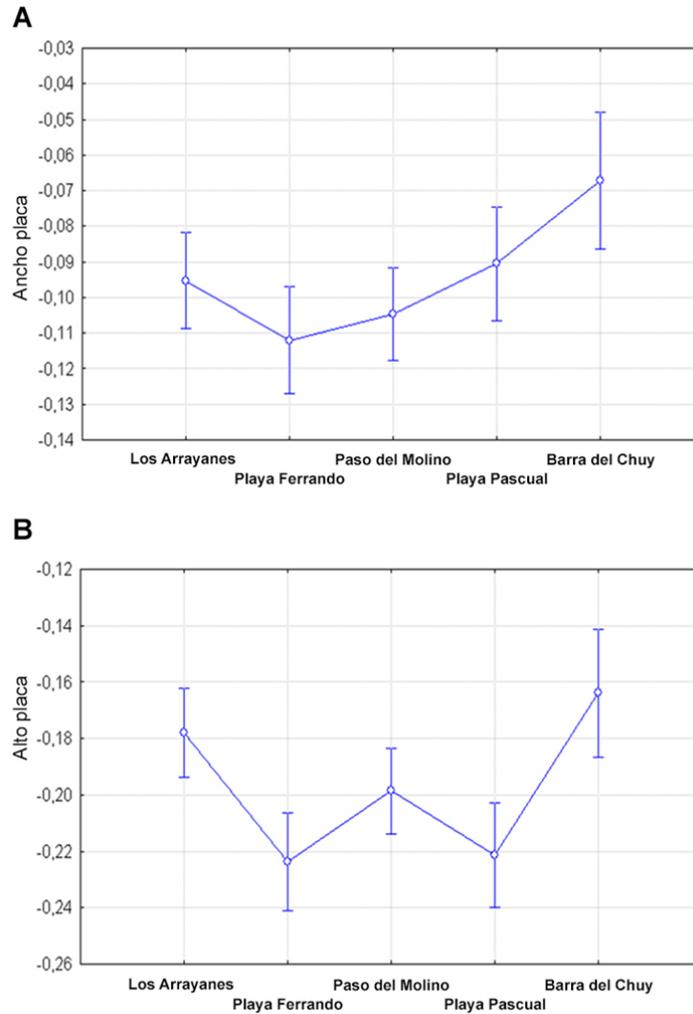


Figura 2.7 – Medias corregidas por tamaño corporal y sus desvíos estándar a partir de las comparaciones de ANCOVA de ancho (A) y alto (B) del epigino en individuos de diferentes localidades. Detalles de las mismas en Tabla 2.1.

No se encontraron diferencias mediante ANCOVA en la interdistancia entre los orificios copulatorios ($F_{4,99} = 2.30$, $p = 0.064$) (Fig. 2.8 A). El análisis global de los índices calculados para el diámetro mayor y menor de los orificios copulatorios (D y d) mostró diferencias significativas a través del ANOVA, tanto en el diámetro mayor ($F_{4,99} = 29.92$, $p < 0.0001$) como en la menor ($F_{4,99} = 42.36$, $p < 0.0001$) (Fig. 2.8 B y C). Las comparaciones entre pares de localidades mostraron que los diámetros menores de los orificios serían más pequeños en los

ejemplares de Barra del Chuy con respecto a todas las demás. En orden creciente le seguiría Los Arrayanes, de menor tamaño que Playa Ferrando y Playa Pascual, y finalmente Paso del Molino con un ancho inferior que el de Playa Pascual (Tabla 2.9, Fig. 2.8 B). Con respecto a los diámetros mayores, las hembras de Barra del Chuy también mostraron poseer el tamaño más reducido, seguido por Los Arrayanes, también de menor tamaño que Playa Ferrando y Playa Pascual (Tabla 2.9, Fig. 2.8 C).

Tabla 2.9 - Comparaciones entre pares de localidades mediante test de Tukey (ANOVA *post hoc*) de las medidas de diámetro mayor (D) y diámetro menor (d) del orificio copulatorio. Las mismas fueron corregidas por el tamaño corporal mediante un cociente con sus respectivos anchos de cefalotórax. En la diagonal superior se muestran valores de p. En la diagonal inferior se muestran valores de Q. Los asteriscos indican diferencias significativas. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Los Arrayanes		Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	d	D	d	D	d	D	d	D	d	D
Los Arrayanes	-	-	<0,001*	<0,001*	0,254	0,013*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Playa Ferrando	6,08	6,92	-	-	0,168	0,480	0,982	0,840	<0,001*	<0,001*
Paso del Molino	2,89	4,61	3,20	2,31	-	-	0,047*	0,067	<0,001*	<0,001*
Playa Pascual	6,85	8,38	0,77	1,46	3,97	3,77	-	-	<0,001*	<0,001*
Barra del Chuy	5,57	7,98	11,65	14,89	8,46	12,58	12,42	16,35	-	-

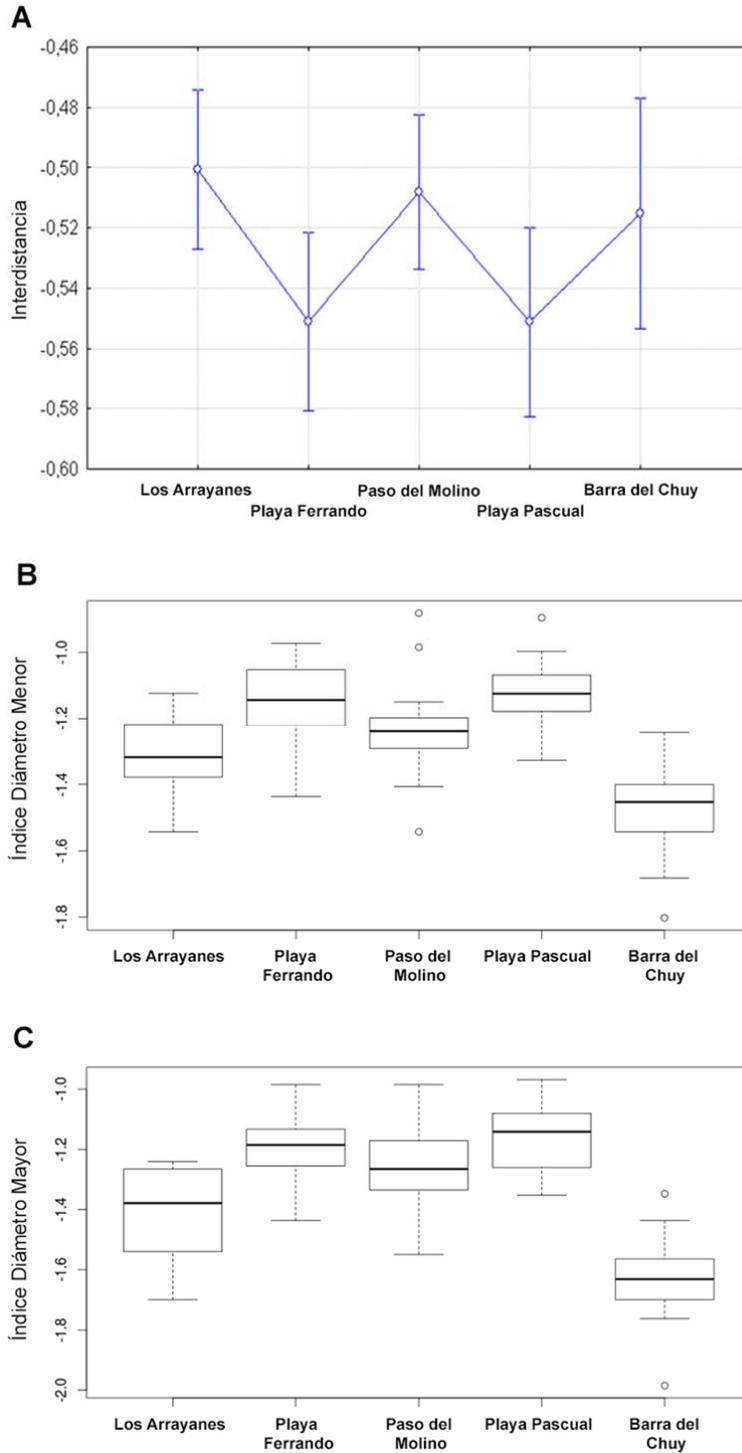


Figura 2.8 – A: Medias corregidas por tamaño corporal y sus correspondientes desvíos estándar a partir de las comparaciones de ANCOVA de la interdistancia entre los orificios copulatorios. B y C: Medidas corregidas del diámetro menor (B) y mayor (C) de los orificios copulatorios a través de un cociente con el ancho de cefalotórax. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

A efectos de tener una aproximación de las eventuales compatibilidades genitales entre los individuos de las distintas localidades se realizaron comparaciones de las medidas absolutas (sin correcciones por tamaño) de las interdistancias entre los orificios copulatorios, así como de los diámetros mayor y menor de los mismos. Las interdistancias entre los orificios copulatorios mostraron diferencias significativas a nivel global (ANOVA, $F_{4,99} = 11.25$, $p < 0.0001$) (Tabla 2.2, Fig. 2.9 A). Las medidas de diámetro menor de los orificios copulatorios no mostraron diferencias a nivel global (Kruskal-Wallis, $H = 1.53$, $p = 0.8016$), mientras que los mayores presentaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $H = 22.34$, $p < 0.001$) (Tabla 2.2, Fig. 2.9 B y C). En las comparaciones de interdistancias entre pares, se observó que las hembras de Barra del Chuy poseen los menores valores, sin encontrar diferencias en las demás localidades (Tabla 2.10, Fig. 2.9 A). Para el caso del diámetro mayor de los orificios copulatorios se encontró que las hembras de Barra del Chuy y Los Arrayanes poseen los menores valores con respecto a las demás, sin diferencias entre ambas (Tabla 2.10, Fig. 2.9 C).

Tabla 2.10 - Comparaciones entre pares de localidades mediante test de Tukey para las medidas de interdistancias entre orificios copulatorios (Interd.) (ANOVA *post hoc*) y del test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni para las medidas de diámetro mayor (D) de los mismos (Kruskal-Wallis *post hoc*). En la diagonal superior se muestran los valores de p, indicando con un asterisco las comparaciones que mostraron diferencias significativas. En la diagonal inferior se muestran los valores de Q (Tukey) o U (Mann-Whitney) según correspondan. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

	Los Arrayanes		Playa Ferrando		Paso del Molino		Playa Pascual		Barra del Chuy	
	D	Interd.	D	Interd.	D	Interd.	D	Interd.	D	Interd.
Los Arrayanes	-	-	1	0,438	1	0,496	0,358	0,169	0,675	<0,001*
Playa Ferrando	161,5	2,407	-	-	1	1	1	0,981	0,003*	<0,001*
Paso del Molino	148,5	2,274	175,5	0,133	-	-	1	0,967	0,008*	<0,001*
Playa Pascual	129	3,189	150	0,782	187	0,916	-	-	<0,001*	<0,001*
Barra del Chuy	131,5	5,185	61,5	7,593	70	7,459	7,026	8,375	-	-

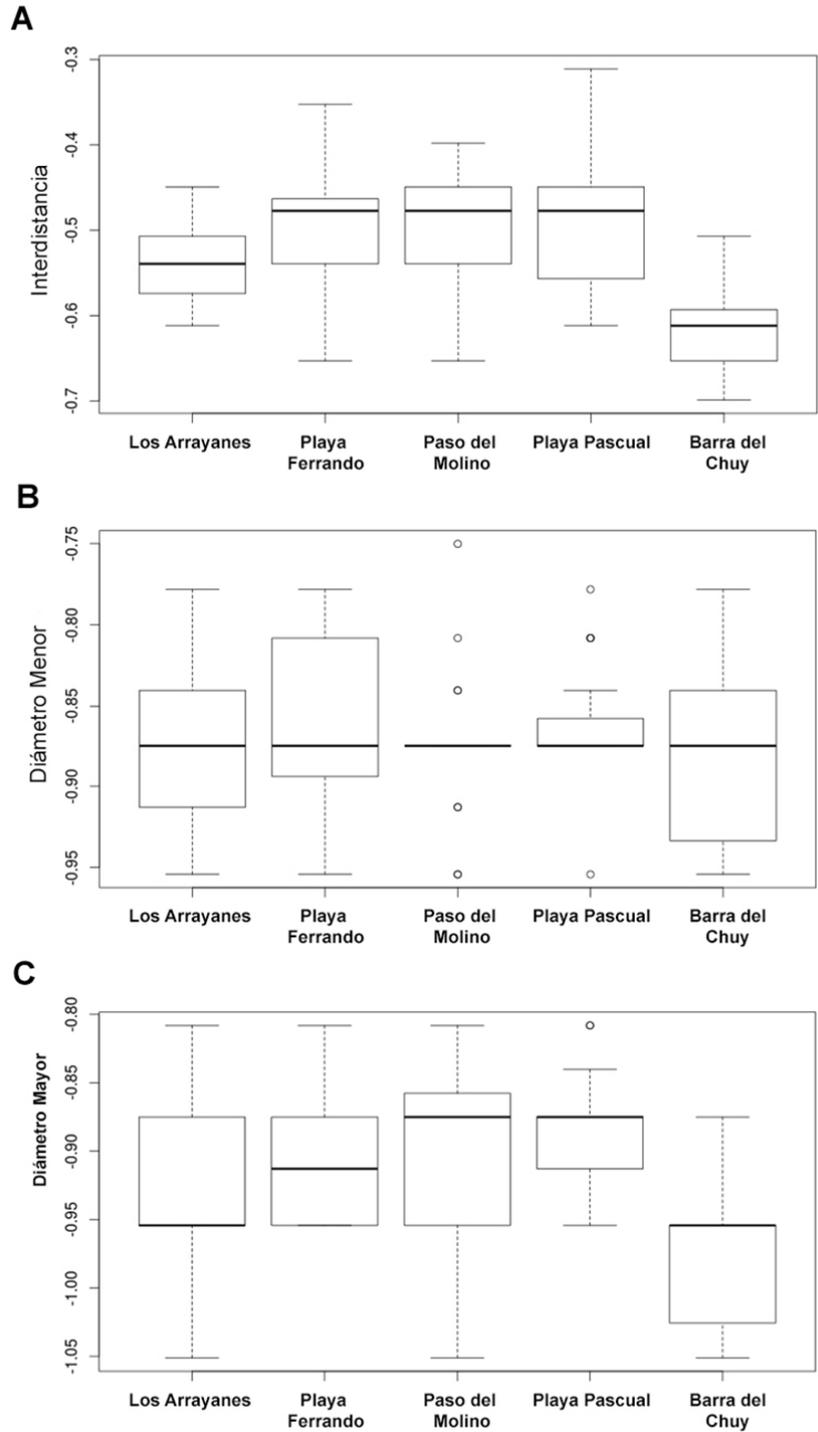


Figura 2.9 – Valores de interdistancias (A), diámetro menor (B) y diámetro mayor (C) de los orificios copulatorios. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

El Análisis de Componentes Principales con las variables morfométricas consideradas mostró que apenas dos de sus componentes logran retener el 86.6% de la varianza total (Tabla 2.11). Para el caso del PC1 se observó que ninguna de las variables estaría particularmente relacionada con el mismo. Por el contrario, en el PC2 se observó que el diámetro menor de los orificios copulatorios sería la variable que más influencia tendría, con un coeficiente de 0.7487. En la Fig. 2.10 se muestran dichos componentes agrupando los individuos tanto por las localidades por como por los distintos tipos de costa (Oceánica, Estuarina y Fluvial).

Tabla 2.11 – Componentes principales a partir de 11 variables morfométricas consideradas. Se indica el porcentaje de varianza explicada por cada componente.

PC	% varianza explicada
1	80,748
2	5,8831
3	5,3543
4	3,5183
5	1,5331
6	1,1251
7	0,6574
8	0,41126
9	0,32057
10	0,28481
11	0,16373

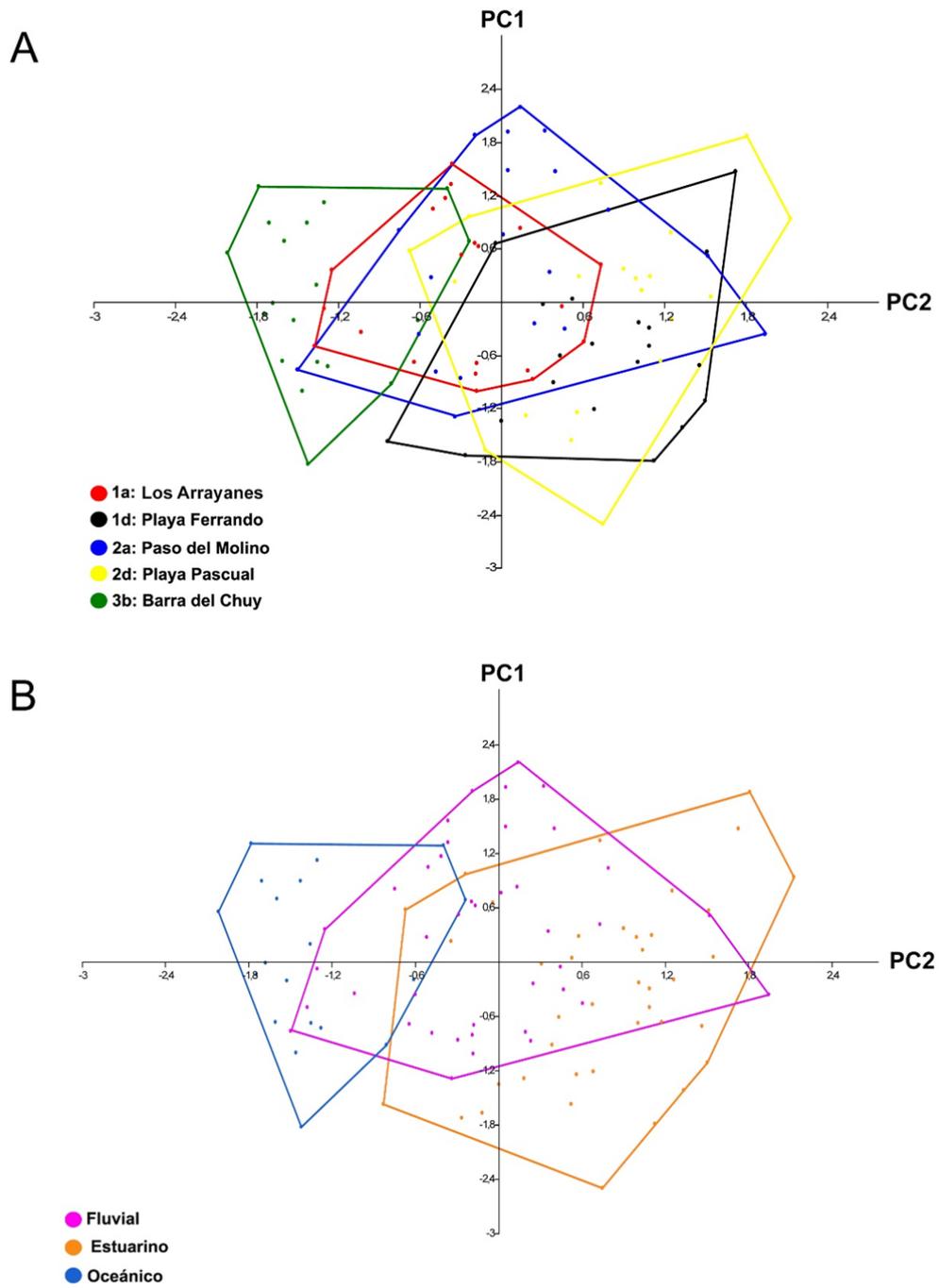


Figura 2.10 – Análisis de Componentes Principales: PC1 vs PC2. A: Por localidades. B: Por tipo de costa.

Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

DISCUSIÓN

Si bien los resultados obtenidos acerca de la variación morfológica en los distintos tipos de ambientes mostraron diferencias en todos los elementos considerados apoyarían parcialmente la hipótesis planteada. Dichas diferencias sugieren que podrían estar ocurriendo presiones selectivas a nivel local.

Las comparaciones de tamaño corporal apoyan en parte la hipótesis propuesta, ya que a pesar de que los organismos de ambientes fluviales mostraron tamaños menores a los de ambientes estuarinos, los de costa oceánica mostraron ser los más pequeños (Tablas 2.3 y 2.4, Fig. 2.3). Estos resultados además contradicen lo sugerido en las observaciones previas en la naturaleza. Por su parte, las diferencias encontradas en los apéndices no apoyaron la hipótesis al no mostrar una mayor longitud relativa en ambientes fluviales, sometidos a frecuentes inundaciones (Figs. 2.4, 2.5 y 2.6; Tablas 2.5, 2.6 y 2.7).

Aunque en artrópodos un mayor tamaño corporal en hembras estaría relacionado con una mayor fecundidad (Fairbairn et al. 2007) otros elementos ambientales podrían estar actuando. Por ejemplo la disponibilidad de alimento podría estar directamente implicada en el tamaño corporal. Pese a las ventajas reproductivas de tener un mayor tamaño, alcanzar y mantener una gran biomasa requiere también de una mayor disponibilidad de recursos (Fairbairn et al. 2007). *Allocosa brasiliensis* posee una dieta muy variada sobre los artrópodos que habitan los arenales, incluyendo un elevado índice de canibalismo, predación intragemio y particularmente de machos sobre hembras adultas (Aisenberg et al. 2009). Se han planteado hipótesis que relacionan el tamaño corporal de los artrópodos que habitan las costas y la morfodinámica de las playas. Una de ellas es la llamada *Habitat Harshness Hypothesis*, la cual postula una tendencia a individuos de mayor tamaño en playas disipativas debido a que aquellos que habitan zonas con mayor energía deberán invertir más energía en estructuras de protección, en detrimento de su tamaño corporal (Dugan et al 1994, Celentano & Defeo 2006). Sin embargo, para los artrópodos de la zona supralitoral el contexto podría ser totalmente opuesto. Esto ha llevado a proponer una hipótesis conocida como *Hypothesis of Habitat Safety*, la que propone que las playas reflectivas serán ambientes más estables para los organismos supralitorales (Defeo & Gómez 2005). Actualmente el conocimiento de la fauna supralitoral, sus

variaciones estacionales, la influencia de las variaciones en la salinidad, la zonación de la entomofauna y su relación con la morfodinámica de las playas se encuentra en incipiente desarrollo (Barboza et al. 2012, Mourglia et al. in press). La información que se dispone hasta el momento postula que estos fenómenos serían más complejos de lo observado a nivel intermareal y sublitoral. Por ejemplo, se pudo ver una marcada zonación de la entomofauna en el eje transversal de la playa. Se observarían marcadas diferencias entre el ecosistema de playa y el de dunas, operando como dos elementos diferentes (Mourglia et al. in press). En cuanto a los ambientes fluviales también se ha intentado relacionar el tamaño corporal de arañas lobo (*Pardosa agricola* (Thorell, 1856) y *P. amentata* (Clerck, 1757)) con los regímenes de perturbaciones provocados por las inundaciones. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia que permita relacionar estos dos fenómenos (Caradine 1998). El hecho de haber criado parte del material en condiciones de laboratorio podría haber introducido ruido adicional en los análisis (Los Arrayanes n = 3, Paso del Molino n = 7). Aunque todos los grupos mostraron poseer varianzas homogéneas, en el grupo procedente de Paso del Molino se pueden observar dos individuos identificables como *outliers* (Fig. 2.3 A). Sin embargo, esto podría deberse a una heterogeneidad mayor a la registrada en los tamaños corporales de esta localidad, siendo necesario aumentar el tamaño muestral.

Las diferencias encontradas en Pedipalpos y Patas podrían estar relacionadas con la captura de presas y el cavado de cuevas. En *Allocosa* se ha descrito que estos apéndices estarían directamente vinculados con la construcción de refugios (Capocasale 1990, Aisenberg & Peretti 2011). La evaluación de los costos asociados a la construcción de cuevas en distintos tipos de sustrato se encuentra actualmente en desarrollo, por lo que en un futuro será posible evaluar estas diferencias con mayor información (Albín com. pers). En licósidos se ha postulado que, además de los quelíceros, los apéndices principalmente implicados en la aprehensión de presas serían las Patas I y II (Rovner 1980). Las diferencias halladas en las longitudes totales de los apéndices (sugeridas a partir de los segmentos Patela-Tibia) y los tamaños de los Fémures, podrían estar indicando diferencias en el tamaño o el tipo de presas disponibles, así como del tipo de sustrato sobre el cual construyen las cuevas. La longitud de las patas también estaría directamente vinculada a la movilidad. Siendo que en esta especie son las hembras quienes presentan mayor movilidad (Aisenberg et al. 2007), la

evolución morfológica de estos apéndices también se encontraría bajo presiones selectivas sobre sus capacidades de movimiento y las de evitar predadores (Aisenberg et al. 2010).

De forma preliminar, se incluyeron muestras de arena recolectadas en las zonas de los arenales en donde fueron colectados los ejemplares. Sobre estas muestras se realizó un análisis granulométrico sobre una muestra de cada playa en el servicio que brinda el Dpto. de Evolución de Cuencas de la Facultad de Ciencias, UdelaR. Sobre las mismas se calculó el tamaño de grano promedio (Gran) mediante el programa Gradistat v.8.0 (Blott & Pye 2001) (Fig. 2.11). Los distintos tamaños de arena fueron clasificados de la siguiente manera: arena de grano fino (Barra del Chuy), arena de tamaño medio (Los Arrayanes, Playa Ferrando y Playa Pascual) y arena muy gruesa (Paso del Molino) (Perry & Taylor 2007). Asimismo, a partir de 3 muestras de cada playa se midió la salinidad contenida en el sedimento (Sal) a partir de la técnica propuesta por Rhoades (1965) y obteniéndose medidas de conductividad (medidas en μS) en un conductímetro EcoSense EC300 (Fig. 2.11). Dichos registros no mostraron relaciones lineales con los parámetros registrados: tamaño corporal (Gran: $p = 0.66$, Sal $p = 0.27$), Pedipalpos (Fémur, Gran: $p = 0.221$, Sal $p = 0.444$; Patela-Tibia, Gran: $p = 0.185$, Sal $p = 0.312$), Patas I (Fémur, Gran: $p = 0.07$, Sal $p = 0.292$; Patela-Tibia, Gran: $p = 0.212$, Sal $p = 0.213$) y Patas II (Fémur, Gran: $p = 0.213$, Sal $p = 0.243$; Patela-Tibia, Gran: $p = 0.219$, Sal $p = 0.191$).

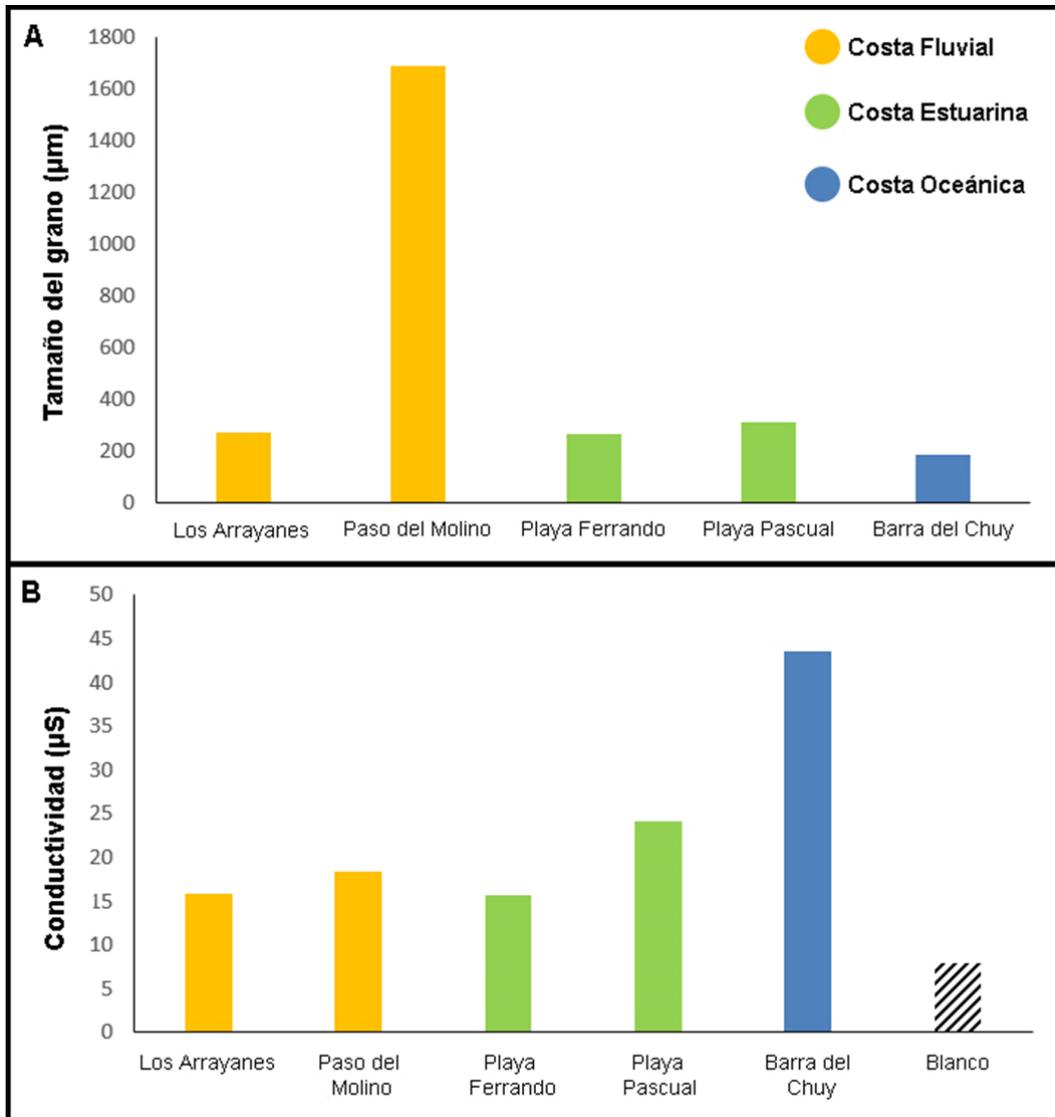


Figura 2.11 – A: Tamaño promedio de los granos de arena de las localidades analizadas (µm). B: Salinidad contenida en muestras de sedimento provenientes de las mismas localidades. Blanco: muestra de agua sin extracto de sedimento. Detalles de las localidades en Tabla 2.1.

Las estructuras genitales de los artrópodos evolucionarían a una mayor velocidad que otros elementos corporales (Eberhard 2004, 2008, 2010, Eberhard & Huber 2010, Huber 2004). Este fenómeno sería el responsable de las grandes diferencias que generalmente se observan a nivel específico en este tipo de estructuras y a partir de esto su extendido uso en la taxonomía de arañas (Huber 2004). La alta variabilidad y solapamiento en la morfología genital

entre especies de arañas lobo ha sido un problema para reconocer caracteres diagnósticos, en particular de especies con homogeneidad morfológica (Dondale & Redner 1983). Dondale (1986) propuso la creación de la subfamilia Allocosinae, compuesta por arañas lobo cuyas hembras presentaban epiginos muy simples, constituidos por una placa sin septo ni atrios. Por tanto, esta simplicidad de estructura hace difícil el reconocimiento morfológico entre las especies de esta subfamilia. En virtud de ello, la morfometría puede aportar elementos para esclarecer dudas a nivel taxonómico. Correa-Ramírez et al. (2010) y Sim et al. (2014) estudiaron caracteres morfológicos y moleculares buscando esclarecer el estatus taxonómico de especies próximas de arañas lobo del género *Pardosa*. Estos autores concluyeron que si bien existía una alta variación morfométrica intraespecífica, algunos caracteres genitales, basados en la forma y tamaño de los mismos, presentaron valor diagnóstico a nivel interespecífico. Correa-Ramírez et al. (2010) encontraron que el tamaño del septo transversal de especies del género *Pardosa* representaba un buen parámetro para el reconocimiento de las especies. Esta estructura se ubica posteriormente a los orificios copuladores y junto con el septo mediano constituyen un tabique que separa ambos orificios contenidos en un atrio en las subfamilias Lycosinae (Useta et al. 2007) y Pardosinae (Sim et al. 2014). Considerando que los epiginos de *A. brasiliensis* carecen del septo, la distancia entre los orificios copuladores aquí analizada podría considerarse como un parámetro comparable con éste. En este estudio, las interdistancias de los orificios copulatorios (comparación corregida por tamaños corporales) y los diámetros menores de los orificios copulatorios no mostraron diferencias significativas entre las localidades. Los orificios copulatorios permiten la penetración del émbolo a los conductos de copulación y por tanto podrían ser elementos claves para la compatibilidad mecánica entre las genitales de ambos sexos. Consecuentemente, las interdistancias entre los orificios copulatorios y sus diámetros menores podrían considerarse caracteres taxonómicos específicos. Estos caracteres podrían ser útiles en la taxonomía y filogenia de arañas lobo y grupos con morfología genital similar. Los datos obtenidos sugieren que a pesar de las diferencias de tamaño corporal y otras variables analizadas, podría existir compatibilidad mecánica entre las genitales de individuos de diferentes localidades. Los resultados morfométricos apoyan la homoespecificidad de los individuos analizados en congruencias con los resultados obtenidos en el Capítulo 1.

Al considerar todas las variables morfométricas en su conjunto (exceptuando el tamaño corporal) se logra distinguir sutilmente el grupo de hembras perteneciente a Barra del Chuy del resto (Fig. 2.10 A), fenómeno que también se advierte al considerar el tipo de costa (Fig. 2.10 B). Esto podría deberse a las diferencias de tamaño corporal encontradas entre las localidades, puesto que las variables morfométricas analizadas se encontraron linealmente correlacionadas con el ancho de cefalotórax.

Los resultados aquí obtenidos sugieren que *A. brasiliensis* posee una gran versatilidad en lo que respecta a su morfología, a pesar de ser idénticas a nivel molecular. El alto grado de especialización sugiere algún tipo de adaptación local a través de fenotipos plásticos. Este hecho apoya fuertemente el vínculo de esta especie a los arenales costeros de distinto tipo.

Resulta llamativo que Barra del Chuy sea la localidad que ha mostrado grandes diferencias morfológicas y también un haplotipo divergente. Si embargo, dicho haplotipo fue encontrado en 2 individuos de los 10 analizados, que no mostraron diferencias apreciables en su tamaño corporal.

Estudios futuros podrían estar orientados a establecer los factores ambientales locales vinculados a las diferencias morfológicas encontradas. Factores tales como la disponibilidad de presas, la presencia de predadores y la morfodinámica de las playas. Otro tipo de elementos vinculados con el sustrato arenoso tales como la salinidad, la composición mineral y el tamaño de los granos también podrían aportar información para la construcción de nuevas hipótesis.

Conclusiones finales

1. *Allocosa brasiliensis* no muestra estructuración poblacional a nivel geográfico en cuanto a su diversidad genética, hecho que se vio reflejado en marcadores independientes y de distinto origen. Esto permite descartar el posible efecto de barridas selectivas sobre el genoma mitocondrial. La ausencia de estructura podría deberse a una expansión poblacional reciente, precedida de un evento de cuello de botella. También podría estar relacionado con la alta capacidad de dispersión de la especie.
2. Las dataciones sugieren un origen reciente de *A. brasiliensis*, al igual que los dos grupos de *A. alticeps* analizados, los cuales serían dos especies diferentes.
3. La presencia de un haplotipo divergente categorizado como Linaje Evolutivamente Independiente sugiere la presencia de un polimorfismo ancestral. Esto apoya la hipótesis de una historia compleja a nivel poblacional en *A. brasiliensis*.
4. El haplotipo considerado como ancestral por su ubicuidad en el espacio sugiere una reciente conexión entre la cuenca de Mar Chiquita (Córdoba, Argentina) y la cuenca del Playa y Océano Atlántico.
5. Con respecto a la morfología *A. brasiliensis* mostraría diferencias marcadas en sus caracteres somáticos de acuerdo a la localidad y no a los patrones predichos en base a las presiones selectivas de cada tipo de ambiente. Las diferencias en tamaño corporal y en los tamaños relativos de distintas estructuras podrían estar vinculadas a factores ambientales locales, manifestándose a través de una alta plasticidad fenotípica.
6. A pesar de la alta variabilidad observada en distintas estructuras somáticas, a nivel genital los caracteres genitales considerados de interés taxonómico no mostraron diferencias entre las localidades. Este hecho en conjunto con la información obtenida a nivel molecular apoyarían el uso de la interdistancia de los orificios copulatorios y el diámetro menor de los mismos en la taxonomía del grupo.

Bibliografía

- Aisenberg A, Viera C, Costa FG. 2007. Daring females, devoted males, and reversed sexual size dimorphism in the sand-dwelling spider *Allocosa brasiliensis* (Araneae, Lycosidae). Behavioral Ecology and Sociobiology 62:29-35.
- Aisenberg A, Costa FG. 2008. Reproductive isolation and sex-role reversal in two sympatric sand-dwelling wolf spiders of the genus *Allocosa*. Canadian Journal of Zoology 86:648-658.
- Aisenberg A, González M, Laborda A, Postiglioni R, Simó M. 2009. Reversed cannibalism, foraging, and surface activities of *Allocosa alticeps* and *Allocosa brasiliensis*: two wolf spiders from coastal sand dunes. The Journal of Arachnology 37:135–138.
- Aisenberg A, Costa FG, González M, Postiglioni R, Pérez-Miles F. 2010. Sexual dimorphism in chelicerae, forelegs and palpal traits in two burrowing wolf spiders (Araneae Lycosidae) with sex-role reversal. Journal of Natural History 44:1189-1202.
- Aisenberg A, Costa FG, González M. 2011a. Male sexual cannibalism in a sand-dwelling wolf spider with sex role reversal. Biological Journal of the Linnean Society 103:68-75.
- Aisenberg A, Peretti AV. 2011. Male burrow digging in a sex role-reversed spider inhabiting water-margin environments. Bulletin of the British Arachnological Society 15: 201–204.
- Aisenberg A, Simó M, Jorge C. 2011b. Spider as a model towards the conservation of coastal sand dunes in Uruguay. En: Murphy JA. Sand Dunes: Conservation, Types and Desertification. Nova Science Publishers, New York.
- Aisenberg A, González M, Laborda A, Postiglioni R, Simó M. 2011c. Spatial distribution, burrow depth and temperature: implications for the sexual strategies in two *Allocosa* wolf spiders. Studies on Neotropical Fauna and Environment 46:147–152.

- Albín A, Simó M, Aisenberg A. 2015. Respuesta a la inundación de la araña lobo cavadora *Allocosa brasiliensis*. V Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Montevideo, Uruguay: 27.
- Alonso-Paz E, Bassagoda MJ. 2006. Flora y vegetación de la costa platense y atlántica uruguaya. En: Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, Conde D (Eds). Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre, Montevideo: 71-88.
- Arnedo MA, Oromí P, Múrria Cesc, Macías-Hernández Nuria, Ribera Carles. 2007. The dark side of an island radiation: systematics and evolution of troglobitic spiders of the genus *Dysdera* Latreille (Araneae:Dysderidae) in the Canary Islands. Invertebrate Systematics 21:623-660.
- Arrigo N, Tuszynski JW, Ehrich D, Gerdes T, Alvarez N. 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. BMC Bioinformatics 10:33.
- Arrigo N, Holderegger R, Alvarez N. 2012. Automated scoring of AFLPs using RawGeno v 2.0, a free R CRAN library. En Pompanon F, Boni A (Eds.). Data Production and Analysis in Population Genomics (pp. 155-175). Springer, New York.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, et al. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18:489-522.
- Avise JC. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts: 447pp.
- Ballard JWO & Whitlock MC. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13:729-744.
- Barboza FR, Gómez J, Lercari D & Defeo O. 2012. Disentangling diversity patterns in sandy beaches along environmental gradients. Plos One 7: e40468.

- Barrio A. 1977. Aportes para la elucidación del status taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis* 37:311-331.
- Bensch S, Åkesson M. 2005. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?. *Molecular Ecology* 14:2899-2914.
- Bidegaray-Batista L, Arnedo MA. 2011. Gone with the plate: the opening of the Western Mediterranean basin drove the diversification of ground-dweller spiders. *BMC Evolutionary Biology* 11:317.
- Bidegaray-Batista L, Gillespie RG, Arnedo MA. 2011. Bringing spiders to the multilocus era: novel anonymous nuclear markers for Harpactocrates ground-dwelling spiders (Araneae: Dysderidae) with application to related genera. *The Journal of Arachnology* 39:506-510.
- Bilde T, Lubin Y, Smith D, Schneider JM, Maklakov AA. 2005. The transition to social inbred mating systems in spiders: role of inbreeding tolerance in a subsocial predecessor. *Evolution* 59:160-174.
- Bilde T, Tuni C, Cariani A, Santini A, Tabarroni C, Garoia F, Goodacre SL. 2009. Characterization of microsatellite loci in the subsocial spider *Stegodyphus lineatus* (Araneae: Eresidae). *Molecular Ecology Resources* 9:128-130.
- Blott SJ & Pye K. 2001. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms* 26:1237-1248.
- Brindle, A., 1971. Bredin-Archbold-Smithsonian biological survey of Dominica: the
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13: 3261–3273.
- Bonte D, Lens L, Maelfait JO, Hoffmann M, Kuijken E. 2003. Patch quality and connectivity influence spatial dynamics in a dune wolfspider. *Oecologia* 135:227–233.

- Bonte D, Lens L, Maelfait JP. 2006. Sand dynamics in coastal dune landscapes constrain diversity and life-history characteristics of spiders. *Journal of Applied Ecology* 43:735-747.
- Bonte D. 2013. Cost–Benefit balance of dispersal and the evolution of conditional dispersal strategies in spiders. En Netwig W (Ed.). *Spider Ecophysiology* (pp. 67-78). Springer, New York.
- Boulton AM, Martinez MG, Blair AP. 1998. Genetic structure in a coastal dune spider (*Geolycosa pikei*) on Long Island, New York Barrier Islands. *Biological Journal of the Linnean Society* 64:69–82.
- Bracco R, García-Rodríguez F, Inda H, del Puerto L, Castiñeira C, Panario D. 2011. Niveles relativos del mar durante el Pleistoceno final-Holoceno en la costa de Uruguay. En: García-Rodríguez F (Ed). *El Holoceno en la zona costera de Uruguay*. CSIC, Montevideo: 65-92.
- Bracco R, Inda H, del Puerto L, Capdepon I, Panario D, Castiñeira C, García-Rodríguez F. 2014. A reply to “Relative sea level during the Holocene in Uruguay”. *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology* 401:166-170.
- Brewer MS, Cotoras DD, Croucher PJP, Gillespie RG. 2014. New sequencing technologies, the development of genomics tools, and their applications in evolutionary arachnology. *The Journal of Arachnology* 42:1–15.
- Bush JWM & Hu DL. 2006. Walking on water: biolocomotion at the interface. *The Annual Review of Fluid Mechanics* 38:339-369.
- Calentano E & DEfeo O. 2006. Habitat harshness and morphodynamics: life history traits of the mole crab *Emerita brasiliensis* in Uruguayan sandy beaches. *Marine Biology* 149:1453–1461.
- Capocasale RM. 1990. Las especies de la subfamilia Hippasinae de América del Sur (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology* 18: 131-141.

- Caradine EL. 1998. The life-history strategies of riparian spiders (Araneae). University of Leicester (Department of Biology). PhD Thesis. University of Leicester 281 pp.
- Carignano CA. 1999. Late Pleistocene to recent climate change in Córdoba Province, Argentina: Geomorphological evidence. *Quaternary International* 57/58:117-134.
- Carlozzi A, Costa FG, Bidegaray L, Postiglioni R, Aisenberg A. 2014. Arañas que vuelan en la costa: estudios de dispersión en *Allocosa brasiliensis* y *Allocosa alticeps* (Araneae: Lycosidae). III Congreso Uruguayo de Zoología, Montevideo, Uruguay:98.
- Coddington JA, Levi HW. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 22:565-592.
- Correa-Ramírez MM, Jiménez ML, García-De León FJ. 2010. Testing species boundaries in *Pardosa sierra* (Araneae_ Lycosidae) using female morphology and COI mtDNA. *The Journal of Arachnology* 38:538–554.
- Costa FG, Capocasale RM. 1984. *Lycosa carbonelli*, sp. nov.; una etoespecie simpátrida, sibilina de *Lycosa thorelli* (Keyserling) (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 423-431.
- Costa FG, Francescoli G. 1991. Analyse expérimentale de l'isolement reproductif entre deux espèces jumelles et sympatriques d'araignées: le *Lycosa thorelli* (Keyserling) et le *L. carbonelli* Costa et Capocasale. *Canadian Journal of Zoology* 69: 1768-1776.
- Costa F, Simó M, Aisenberg A. 2006. Composición y ecología de la fauna epigea de Marindia (Canelones, Uruguay) con especial énfasis en las arañas: un estudio de dos años con trampas de intercepción. En Menafra R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F y Conde D. (Eds.). Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya (pp. 427-436). Vida Silvestre, Montevideo.
- Clement M, Snell Q, Walke P, Posada D, Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp* 2:184.

- Crawford LA, Koscinski D, Keyghobadi N. 2012. A call for more transparent reporting of error rates: the quality of AFLP data in ecological and evolutionary research. *Molecular Ecology* 21: 5911–5917.
- Croucher PJP, Oxford GS, Gillespie RG. 2011. Population structure and dispersal in a patchy landscape: nuclear and mitochondrial markers reveal area effects in the spider *Theridion californicum* (Araneae: Theridiidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 104:600-620.
- Dasmahapatra KK. 2005. The use of AFLP markers for estimating relatedness and inbreeding. PhD Tesis. Pembroke College, University of Cambridge 197pp.
- Defeo O & Gómez J. 2005. Morphodynamics and habitat safety in sandy beaches: life-history adaptations in a supralittoral amphipod. *Marine Ecology Progress Series* 293:143–153.
- Defeo O, Lercari D, De Álava A, Gómez J, Martínez G, Celentano E, Lozoya JP, Saucó S, Carrizo D & Delgado E. 2006. Ecología de playas arenosas de la costa uruguaya: una revisión de 25 años de investigación. En Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F y Conde D. (Eds.). *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya* (pp. 363-370). Vida Silvestre, Montevideo.
- Depaulis F, Mousset S, Veuille M. 2003. Power of Neutrality Tests to Detect Bottlenecks and Hitchhiking. *Journal of Molecular Evolution*. 57:S190–S200.
- De Busschere C, Baert I, Van Bellehem SM, Dekoninck W, Hendrickx F. 2012. Parallel phenotypic evolution in a wolf spider radiation on Galápagos. *Biological Journal of the Linnean Society* 106:123-136.
- Del Puerto L, Bracco R, Inda H, Gutiérrez O, Panario D, García-Rodríguez F. 2013. Assessing links between late Holocene climate change and paleolimnological development of Peña Lagoon using opal phytoliths, physical, and geochemical proxies. *Quaternary International* 287:89-100.

- Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Lemes Landeiro V, Pires de Campos Telles M, Rangel TF, Bini LM. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology* 36:475-485.
- Di Persia DH, Neiff JJ. 1986. The Uruguay river system. En Davies BR, Walker KF (Eds.). *The ecology of river systems* (pp. 599-621). Springer, Dordrecht.
- Dondale CD. 1986. The subfamilies of wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Actas X Congreso Internacional de Aracnología, Jaca, España* 1:327-332.
- Dondale CD, Redner JH. 1983. The wolf spider genus *Allocosa* in North and Central America (Araneae: Lycosidae). *The Canadian Entomologist* 287:933-964.
- Dondale CD, Redner JH. 1990. The Wolf Spiders, Nurseryweb Spiders, and Lynx Spiders of Canada and Alaska (Araneae: Lycosidae, Pisauridae, and Oxyopidae). Part 17. *The Insects and Arachnids of Canada*. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa.
- Drummond A J, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A. 2010. Geneious v5.5 <<http://www.geneious.com/>>.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29:1969-1973.
- Dugan JE, Hubbard DM, Wenner AM. 1994. Geographic variation in life history of the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson) on the California coast: Relationships to environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 181:255-278.
- Duncan SI, Riechert SE, Fitzpatrick BM, Fordyce JA. 2010. Relatedness and genetic structure in a socially polymorphic population of the spider *Anelosimus studiosus*. *Molecular Ecology* 19:810-818.
- D'Anatro A, Wlasiuk G, Lessa EP. 2011. Historia climática del Cuaternario tardío y estructura poblacional del tucu-tucu de Río Negro *Ctenomys rionegrensis* Langguth y Abella. En:

- García-Rodríguez (Ed.). El Holoceno en la zona costera de Uruguay (pp. 155-172). Universidad de la República, Montevideo.
- Eberhard WG. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution* 58:1947-1970.
- Eberhard WG. 2008. Static allometry and animal genitalia. *Evolution* 63:48-66.
- Eberhard WG. 2010. Rapid divergent evolution of genitalia: theory and data updated. En Leonard J, Córdoba-Aguilar A. *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals* (pp. 40-78). Oxford University Press, Londres.
- Eberhard WG, Huber BA. 2010. Spider genitalia: precise maneuvers with a numb structure. En Leonard J, Córdoba-Aguilar A. *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals* (pp. 249-284). Oxford University Press, New York.
- Einsele G. 1992. *Sedimentary basins. Evolution, facies and sediment budgets*. Springer Verlag, Tübingen 628 pp.
- Eraly D. 2012. Linking life history, physiological and genetic consequences of exposure to metal stress: a case study on wolf spiders. PhD Tesis. Faculty of Sciences, Ghent University 256pp.
- Esquivel-Bobadilla S, Lozano-Garza OA, García-De-León FJ, Barriga-Sosa IA, Jiménez ML. 2013. Development and characterization of 14 microsatellite loci in the beach wolf spider (*Arctosa littoralis*), using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5:261-263.
- Ezard T, Fujisawa T, Barraclough TG. 2009. SPLITS: SPecies' Limits by Threshold Statistics. Rpackage version 1.0-11/r29. Available from <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>.
- Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T. 2007. *Sex, size and gender roles: Evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford University Press, New York. 264pp.
- Foelix RF. 2011. *Biology of spiders*. Oxford University Press, New York 428pp.

- Foellmer MW, Fairbairn DJ. 2005. Selection on male size, leg length and condition during mate search in a sexually highly dimorphic orb-weaving spider. *Oecologia* 142:653–662.
- Foellmer MW, Moya-Laraño J. 2007. Sexual size dimorphism in spiders: patterns and processes. En: Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T. (Eds). *Sex, size, and gender roles. Evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford, University Press: 71–81.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Fontaneto D, Herniou EA, Boschetti C, Caprioli M, Melone G, Ricci C, Barraclough TG. 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *Plos Biology* 5:914-921.
- Framenau VW. 2005. Gender specific differences in activity and home range reflect morphological dimorphism in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 33:334-346.
- Funke S, Huber BA. 2005. Allometry of genitalia and fighting structures in *Linyphia triangularis* (Araneae, Linyphiidae). *The Journal of Arachnology* 33:870-872.
- Futuyma DJ. 2005. *Evolution*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts 603pp.
- Garrick RC, Caccone A, Sunnucks P. 2010. Inference of population history by coupling exploratory and model-driven phylogeographic analyses. *International Journal of Molecular Sciences* 11:1190-1227.
- Greenstone M. 1982. Ballooning frequency and habitat predictability in two wolf spider species (Lycosidae: *Pardosa*). *The Florida Entomologist* 65:83-89.
- Ghione S, Simó M, Aisenberg, Costa FG. 2013. *Allocosa brasiliensis* (Araneae, Lycosidae) as a bioindicator of coastal sand dunes in Uruguay. *Arachnology* 16:94-98.
- Griswold CE. 1993. Investigations into the phylogeny of the lycosid spiders and their kin (Arachnida: Araneae: Lycosoidea). *Smithsonian contributions to zoology* 539:39pp.

- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Hare MP. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16:700-706.
- Hataway RA, Reed DH, Noonan BP. 2011. Development of 10 microsatellite loci in the wolf spider *Arctosa sancterosae* (Araneae: Lycosidae). *Conservation Genetics Resources* 3:271-273.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hennig C, Hausdorf B. 2008. The prabclus package version 2.1-2. London: Department of Statistical Science, University College London. Available from:<http://cran.r-project.org/>.
- Hepner M, Milasowszky N. 2006. Morphological separation of the Central European *Trochosa* females (Araneae, Lycosidae). *Arachnologische Mitteilungen* 31:1-7.
- Hollander J & Dijkstra H. 1974. *Pardosa vlijmi* sp. nov., a new ethospecies sibling *Pardosa proxima* (C.L. Koch, 1848), from France, with description of courtship display (Araneae, Lycosidae). *Beaufortia* 22:57-65.
- Huber BA. 2004. The significance of copulatory structures in spider systematics. En: Schult (ed.) *Biosemiotik – praktische Anwendung und Konsequenzen für die Einzelwissenschaften*, pp. 89-100. VWB Verlag, Berlin.
- Huber BA, Rheims CA, Brescovit DA. 2005. Speciation without changes in genital shape: A case study on Brazilian pholcid spiders (Araneae: Pholcidae). *Zoologischer Anzeiger* 243:273-279.
- Huelsenbeck JP, Andolfatto P. 2007. Inference of population structure under a Dirichlet process model. *Genetics* 175:1787–1802.
- Hudson RR, Slatkin M & Maddison WP. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583-589.

- Hudson RR. 2000. A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. *Genetics* 155:2011-2014.
- Hudson-Edwards K. 2007. En: Perry C, Taylor K (Eds). *Environmental sedimentology*. Blackwell Publishing, Oxford: 75-108.
- International Commission on Stratigraphy. 2015. *International Stratigraphic Chart*. 1 p.
- Ji YJ, Smith H, Zhang DX, Hewitt GM. 2004. Ten polymorphic microsatellite DNA loci for paternity and population genetics analysis in the fen raft spider (*Dolomedes plantarius*). *Molecular Ecology Notes* 4:274-276.
- Knowles LL & Madisson WP. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11:2623-2635.
- Kolenc F, Borteiro C, Baldo D, Ferraro DP, Prigioni C. 2009. The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa* 1969:1-35.
- Kröhling DM, Iriondo M. 1999. Upper Quaternary Palaeoclimates of the Mar Chiquita area, North Pampa, Argentina. *Quaternary International* 57/58: 149-163.
- Lambeets K, Breyne P, Bonte D. 2010. Spatial genetic variation of a riparian wolf spider *Pardosa agricola* (Thorell, 1856) on lowland river banks: The importance of functional connectivity in linear spatial systems. *Biological Conservation* 143:660-668.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Logunov DV. 2011. Sexual size dimorphism in burrowing wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences* 315:274-288.
- Lucchini V. 2003. AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management. *C. R. Biologies* 326:S43.S48.

- Macías-Hernández N, Oromí P, Arnedo MA. 2010. Integrative taxonomy uncovers hidden species diversity in woodlouse hunter spiders (Araneae, Dysderidae) endemic to the Macaronesian archipelagos. *Systematics and Biodiversity* 8:531-553.
- Macías-Hernández N, Bidegaray-Batista L, Oromí P, Arnedo MA. 2012. The odd couple: contrasting phylogeographic patterns in two sympatric sibling species of woodlouse-hunter spiders in the Canary Islands. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 51:29-37.
- Madden JR, Lowe TJ, Fuller HV, Coe RC, Dasmahapatra KK, Amos W, Jury F. 2004. Neighbouring male spotted bowerbirds are not related, but do maraud each other. *Animal Behaviour* 68:751-758.
- Maddison WP. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* 46:523-536.
- Martínez S, Rojas A. 2006. Asociaciones de moluscos bentónicos cuaternarios en la costa uruguaya: implicancias paleoecológicas. En Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F y Conde D. (Eds.). Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya (pp. 189-196). Vida Silvestre, Montevideo.
- Martínez S, Rojas A. 2011. Asociaciones de moluscos marinos y estuarinos del Holoceno de Uruguay. En: García-Rodríguez (Ed.). El Holoceno en la zona costera de Uruguay (pp. 93-116). Universidad de la República, Montevideo.
- Martínez S, Rojas A. 2013. Relative sea level during the Holocene in Uruguay. *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology*. 374:123-131.
- Martínez S, Rojas A. 2014. Comments to 'A reply to "Relative sea level during the Holocene in Uruguay"' by Bracco et al. (2013). *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology* 401:171-172.
- Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, Conde D. 2006. Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre, Montevideo 667pp.
- Mendelson TC, Shaw KL. 2005. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* 395: 161-177.

- Meudt HM, Clarke AC. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in plant science* 12:106-117.
- Ministerio de Transporte y Obras Públicas-Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 1979. Proyecto Conservación y Mejora de Playas, Montevideo, Ministerio de Transporte y Obras Públicas – Proyecto de las Naciones Unidas para el Desarrollo, UNESCO 593 pp.
- Milá B, Carranza S, Guillaume O, Colbert J. 2010. Marked genetic structuring and extreme dispersal limitation in the Pyrenean brook newt *Calotriton asper* (Amphibia: Salamandridae) revealed by genome-wide AFLP but not mtDNA. *Molecular Ecology* 19:108-120.
- Milasowszky N, Herberstein ME, Zulka KP. 1998. Morphological separation of *Trochosa robusta* (Simon, 1876) and *Trochosa ruricola* (De Geer, 1778) females (Araneae: Lycosidae). *Proceedings of the 17th European Colloquium of Arachnology, Edingburgh, Scotland* 1:91-96.
- Mon R, Gutiérrez AA. 2009. The Mar Chiquita Lake: an indicator of intraplate deformation in the central plain of Argentina. *Geomorphology* 111:111-122.
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M, Fujisawa T, Balke M, Inward DJ, et al. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* 58:298–311.
- Montes de Oca L, D'Elía G, Pérez-Miles F. 2012. Evaluation of the taxonomic status of populations of the tarantula *Grammostola anthracina* (Koch, 1842) (Mygalomorphae, Therapsidae). *27th European Congress of Arachnology*:102.
- Mourglia V, González-Vainer P, Defeo O. 2015. Distributional patterns in an insect community inhabiting a sandy beach of Uruguay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*: in press.
- Murphy NP, Framenau VW, Donnellan SC, Harvey MS, Park YC, Austin AD. 2006. Phylogenetic reconstruction of the wolf spiders (Araneae: Lycosidae) using sequences from the 12S rRNA, 28S rRNA, and NADH1 genes: Implications for classification,

- biogeography, and the evolution of web building behavior. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:583-602.
- Nei M & Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Panario D, Gutiérrez O. 2011. Introducción a la geomorfología de lagunas costeras, lagos someros y charcas de Uruguay. En: García-Rodríguez (Ed.). *El Holoceno en la zona costera de Uruguay* (pp. 49-63). Universidad de la República, Montevideo.
- Peltier WR. 2004. Global glacial isostatic adjustment: paleogeodetic and space geodetic test of the ICE-4G(VM2) model. *Journal of Quaternary Science* 17:491-510.
- Pérez-Miles F. 1988. Variación relativa de caracteres somáticos y genitales en *Grammostola mollicoma* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology* 17:263-274.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Perry C & Taylor K. 2007. *Environmental sedimentology*. Manchester Metropolitan University 441 pp.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847-859.
- PopART: Population Analysis with Reticulate Trees. <http://popart.otago.ac.nz>.
- Postiglioni R, Carozzi A, Bidegaray L, Aisenberg A. 2015. Dispersión aérea en condiciones naturales de dos especies de araña lobo de la costa: *Allocosa brasiliensis* y *A. alticeps*. V Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Montevideo, Uruguay: 36.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55:595-609.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16:37-45.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19:2092-2100.
- Rhoades JD. 1965. Cation exchange capacity. En: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Agronomy Monograph 9.2 (pp. 149-157). American Society of Agronomy, Madison.
- Rohlf FJ. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 21:299-316.
- Rovner JS. 1980. Morphological and ethological adaptations for prey capture in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology* 8:201-215.
- Rütten KB, Schulz I, Olek K, Uhl G. 2001. Polymorphic microsatellite markers in the spider *Pholcus phalangioides* isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology Notes* 1:255-257.
- Servicio Geográfico Militar. 2013. Atlas cartográfico del Uruguay.
- Sim KA, Buddle CM, Wheeler TA. 2014. Species boundaries of *Pardosa concinna* and *P. lapponica* (Araneae: Lycosidae) in the northern Nearctic: morphology and DNA barcodes. *Zootaxa* 3884:169-178.

- Simmons MP, Zhang LB, Webb CT, Müller K. 2007. A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:528-542.
- Simó M, Seguí R, Pérez-Miles F. 2002. The copulatory organs of the cryptic species *Lycosa thorelli* and *Lycosa carbonelli* and their hybrid progeny, with notes on their taxonomy (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 30:140-145.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*: 561-701.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- Smith D, Rijm RV, Henschel J, Bilde T, Lubin Y. 2009. Amplified fragment length polymorphism fingerprints support limited gene flow among social spider populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 97:235-246.
- Stratton GE. 2005. Evolution of ornamentation and courtship behavior in *Schizocosa*: insights from a phylogeny based on morphology (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 33:347-376.
- Stratton GE, Uetz GW. 1981. Acoustic communication and reproductive isolation in two species of wolf spiders. *Science* 214:575-577.
- Suter RB & Gruenwald J. 2000. Spider size and locomotion on the water surface (Araneae, Pisauridae). *Journal of Arachnology* 28:300-308.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Thomson RC, Wang IJ, Johnson JR. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology* 19:2184-2195.

- Tieppo Da Silveira LC, Bonatto SL. 2009. Isolation and characterization of 12 dinucleotide microsatellite loci in *Paratrechalea galianoae* (Araneae, Trechaleidae), a nuptial gift-spider. *Molecular Ecology Resources* 9:539-541.
- Toews DPL & Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907-3930.
- Uetz GW, Denterlein G. 1979. Courtship behavior, habitat, and reproductive isolation in *Schizocosa rovneri* Uetz and Dondale (Araneae : Lycosidae). *Journal of Arachnology* 7:121-128.
- Uetz GW, Dondale CD. 1979. A new wolf spider of the genus *Schizocosa* (Araneae: Lycosidae) from Illinois. *Journal of Arachnology* 7:86-88.
- Useta G, Huber BA, Costa FG. 2007. Spermathecal morphology and sperm dynamics in the female *Schizocosa malitiosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology* 104:777-785.
- Vink CJ, Mitchell AD, Paterson AM. 2002. A preliminary molecular analysis of phylogenetic relationships of Australasian wolf spider genera (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 30:227-237.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- World Spider Catalog (2015). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 16, accessed on November 5th, 2015.
- Zar JH. 2009. *Biostatistical Analysis*. Pearson Prentice Hall, New Jersey 946pp.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2004. *Geometric morphometrics for Biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, London 456pp.

ANEXO: Técnicas moleculares

1. **cox1**

Para las reacciones de PCR se utilizaron los pares de primers C1-J-1490 (Forward: 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') (Folmer et al. 1994) y C1-N-2191 (Reverse: 5' CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC 3') (Simon et al. 1994). Las reacciones fueron llevadas a cabo en volúmenes finales de 25 µl conteniendo 5 µl de Buffer Mix, 0,5 µl de cada primer, 0,1 µl de Taq y 1 µl de ADN. Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos (min.), 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 segundos (seg.), 45°C por 45 seg., 72°C por 45 seg.) y una extensión final a 72°C por 5 min. Las reacciones fueron llevadas a cabo en los termocicladores.

- **AFLP**

Qué son?

Tras la acción de las enzimas de restricción se obtienen fragmentos de distinto peso molecular. A los mismos es posible adicionarles fragmentos particularmente diseñados para tales enzimas (adaptadores), los cuales pueden ir acompañados de secuencias conocidas que posteriormente puedan ser utilizadas como sitio de unión de primers para reacciones de PCR. Luego de esta ligación es necesario llevar a cabo dos reacciones de PCR consecutivas con distintos objetivos. La primera, o preamplificación, permite aumentar la cantidad de fragmentos con adaptadores en ambos extremos. En la segunda se amplifica selectivamente los fragmentos que azarosamente coincidan con la adición arbitraria de algunos nucleóticos en el extremo 3' de los primers (amplificación selectiva). De esta manera se logra disminuir el número de fragmentos consiguiendo obtener un número de loci fácilmente analizable. A efectos de aumentar la especificidad de las reacciones, la preamplificación de la primer PCR incluyó un nucleótido selectivo en sus primers, mientras que la de la amplificación selectiva incluyó dos.

De esta manera también es posible amplificar selectivamente fragmentos con los distintos extremos generados por la acción de más de una enzima de restricción (para el caso de dos enzimas se obtendrán 4 combinaciones de extremos 1-1, 2-2, 1-2 y 2-1). Cada uno de ellos podrá ser luego identificado mediante el marcaje de uno de los primers de cada par con un colorante fluorescente (Dye), el cual será registrado posteriormente por medio de electroforesis capilar. Por lo tanto los loci estarán indicados como picos de intensidad de fluorescencia (medidos en rfu: Relative Fluorescence Units), correspondientes a los colores utilizados y ordenados por peso molecular. Toda esta información se ordena en archivos individuales en formato Fasta (.fsa) llamados electroferogramas. Los mismos son posteriormente visualizados, editados y analizados en softwares como PeakScanner y RawGeno.

Sin embargo, no todos los loci generados serán polimórficos, ya que podrán existir diferencias entre los individuos que dependerán de la acción del azar en 3 fenómenos: 1) Mutaciones en los sitios de corte de la enzima de restricción, por lo que el ADN no será cortado en ese sitio y los poseedores serán el alelo ausente. 2) Mutaciones en uno o más de los sitios en donde se unen los primers de la amplificación selectiva, por lo que el locus no amplificará. 3) Si existen inserciones o deleciones entre dos sitios de corte, lo que podrá modificar su tamaño. Otro elemento a destacar de esta técnica es que el nivel de resolución de los AFLP se puede modificar mediante el tipo y número de enzimas de restricción utilizadas, siendo muy utilizadas en estudios a nivel poblacional, aunque ha sido utilizada incluso en estudios de paternidad.

Trabajo de laboratorio

Para la obtención de los AFLP las concentraciones de las extracciones de ADN se uniformizaron a 200 ng/ μ l, mediante la precipitación en Etanol y resuspensión en agua. Las reacciones de digestión y ligación se llevaron a cabo en serie mediante la adición de los diferentes mix y la incubación a las temperaturas requeridas en cada reacción. Las mismas se realizaron sobre diluciones 1:25 del ADN (200 ng/ μ l) en etanol, agua y acetato de amonio. La primer reacción de digestión se realizó con la enzima Taq I (Sigma) (10 U), incubada a 65°C durante 2 horas (hs.), seguida de la enzima EcoRI (Sigma) (15U), incubada a 37°C durante 2 hs., en ambas reacciones se siguieron las recomendaciones del fabricante. Posteriormente la

acción de ambas enzimas fue interrumpida mediante su desnaturalización, incubando las muestras a 80°C durante 20 min. Acto seguido se adicionaron los pares de adaptadores para EcoRI y TaqI mediante la acción de la enzima T4 DNA ligase (Roche) incubando las muestras a 37°C durante 3 hs. y siguiendo con las recomendaciones del fabricante. Culinada la etapa de digestión y ligación se siguió con la etapa de preamplificación. Dicha reacción de PCR se llevaron a cabo en volúmenes finales de 25 µl conteniendo 0.5 µl del EcoRI pre-amp primer, 0.5 µl del TaqI pre-amp primer, 5 µl de Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 2.25 µl de MgCl₂ (25mM) (Promega), 0.1 µl de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 0.5 µl dNTP (10mM) y 3,5 µl del producto de digestión y ligación diluidos 1:10 en el buffer Low TE. Las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min., 30 ciclos de amplificación (94°C por 30 seg., 50°C por 60 seg. y 72°C por 60 seg.) y una extensión final de 72°C por 20 min. Finalmente se llevaron a cabo las 4 reacciones de amplificación selectiva, las cuales se realizaron en volúmenes finales de 12 µl. En cada mix se adicionaron 0,9 µl de cada uno de los primers, organizados en los pares: PET - CCA + EcoRI Amp1 (ACA), EcoRI Amp1 (ACA) + FAM – CAC, VIC - CTG + EcoRI Amp2 (ATG) y TaqI Amp + NED – ACA. Complementariamente cada reacción contó con 1,2 µl de Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 1,1 µl de MgCl₂ (25mM) (Promega), 0.06 µl de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 0.24 µl dNTP (10mM) y 2 µl de l producto de preamplificación diluido 1:10 en Low TE. Las condiciones de las amplificaciones selectivas incluyeron 94°C durante 3 min, 12 ciclos de: 94°C por 30 seg, 65°C por 60 seg (reduciendo 0,7°C por ciclo) y 72°C por 60 seg, seguidos de 23 ciclos de: 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg, 72°C por 60 seg y 72°C por 20 min. Una vez culminadas estas reacciones, los resultados de las 4 reacciones (las correspondientes a cada individuo) deben ser unificados en un único tubo, de forma tal de que el mismo contenga los resultados de los 4 tipos de fragmentos amplificados. Dicha mezcla de productos fue precipitada y resuspendida con etanol, EDTA (0,125 M) y agua. Por último, las muestras deben ser preparadas para su genotipado colocando 2 µl de la mezcla resuspendida, 9,5 µl de Formamida y 0,5 µl de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard, el cual es utilizado como marcador de peso molecular entre los 35 y 500 pb. El genotipado por electroforesis capilar se llevó a cabo en los Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB, www.ccitub.edu) mediante GeneMapper (Applied Biosystems).