

TAXONOMÍA DE LA TARÁNTULA
Grammostola anthracina
(ARANEAE: MYGALOMORPHAE:
THERAPHOSIDAE): ESTUDIO BASADO
EN SECUENCIAS DE ADN.

LAURA MONTES DE OCA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
MONTEVIDEO, URUGUAY

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN ZOOLOGÍA
PEDECIBA

2014



Orientador



Dr. Guillermo D'Elía

Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Co- orientador



Dr. Fernando Pérez-Miles

Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Tribunal



Dra. Susana González

Dr. Marcelo Loureiro

Dr. Miguel Simó

AGRADECIMIENTOS

Es difícil jerarquizar los agradecimientos, y muchos podrían estar en el primer lugar, porque sus aportes fueron desde diferentes ámbitos. Gracias a ellos sigo cerrando etapas, y comenzando nuevos sueños.

Mis orientadores Guillermo D'Elía y Fernando Pérez-Miles, que depositaron su confianza y tiempo durante estos años para realizar este trabajo. En todo momento he contado con su entusiasmo y sus invalorable aportes permitiéndome madurar académicamente.

A Fernando Pérez-Miles, Fernando Costa, Lucía Ziegler, Flavio Pasos, Rodrigo Becco, Nicolás Boullosan, Marcelo Loureiro, Sebastian Serra, José Bessonart, Sebastián Fierro, Carolina Abud y Paco Majic por acompañarme a diferentes rincones del país para recolectar arañas, sin ellos habría quedado perdida en la primera salida a campo.

El trabajo de laboratorio se realizó gracias a mis *madrinas* de tesis Mariana Cosse (Laboratorio de Genética de la Conservación, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC) e Ivanna Tomasco (Sección Evolución, Facultad de Ciencias, UdeLaR). Además de brindarme un espacio de trabajo, ellas me enseñaron las técnicas de extracción y PCR, presenciando cada etapa, ayudando y explicando cada paso, revelando las soluciones para obtener el material necesario para secuenciar.

Ya avanzando en la tesis, aparecen los héroes en acción: Cecilia da Silva, Lorena Coelho, Lucía Ziegler, Andrés Parada, Alejandro D'Anatro y Leticia Bidegaray, quienes pacientemente me ayudaron con los programas de análisis filogenéticos y estadísticos, respondiendo en cada momento de dificultad, aclarando la mente, permitiendo seguir adelante.

Cerrando formalmente esta etapa están los miembros del tribunal, Susana González, Miguel Simó y Marcelo Loureiro, quienes aceptaron evaluar este trabajo y dedicaron su tiempo a la lectura y contribuciones de la tesis.

Un especial reconocimiento a toda mi familia por mantener la curiosidad y apoyar mi trabajo, especialmente a mis padres Javier y Rosa quienes me dieron todo lo que estaba a su alcance para realizar la carrera de bióloga. A mi hermana Verónica y mi sobrina Julia junto con mis amigos Verónica, Viviana, Lucía, Majo, Nanga, Ana, Mariana,

Patricia, Soledad, Lorena, Gabriela, Jorge, Flavio y Luciana por compartir desde hace años mi pasión por las arañas y darme lindos momentos de distensión. Quisiera expresar una enorme gratitud hacia Claudio, quien no solo apoyó e incentivó este posgrado, también vivió cada momento de alegría e infortunios (los que me conocen saben con qué tiene que lidiar) como un gran caballero, y sobre todo aún me acompaña, estimulando cada paso que realizo.

Corría el año 1997 cuando conocí a quienes iluminaron mi camino hacia el maravilloso mundo de las arañas: Fernando Pérez-Miles y Fernando Costa. Ellos me dieron la oportunidad de investigar y estudiar, estimulando mi formación profesional y personal. Y aquí estamos, en el año 2014 y seguimos juntos colaborando cada uno desde su lugar a aportar nuevos conocimientos sobre estos animales que tanto nos gustan.

A los compañeros del LEEE, y aracnólogos por el apoyo y colaboración, brindando siempre un ameno entorno laboral.

Finalmente debo agradecer a la ANII por otorgarme una beca para finalizar la maestría y al PEDECIBA por su apoyo financiero para asistir a cursos en el exterior.

Y a quienes mi memoria jugó una mala pasada (anotarse aquí)

.....
.....

GRACIAS A TODOS.

"The so-called species problem can be reduced to a simple choice between two alternatives: Are species realities of nature or are they simply theoretical constructs of the human mind?"

-Mayr, 1982

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	
Antecedentes	3
El problema a estudiar	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
METODOLOGÍA	
1 <i>Distribución Geográfica de los Morfos</i>	12
2 <i>Análisis Genealógico</i>	12
- Diseño de muestreo	12
- Obtención de secuencias de ADN	14
- Alineamiento, diversidad molecular y reconstrucción filogenética	15
- Estructura y diversidad genética, y demografía	19
3 <i>Caracteres Morfológicos</i>	19
RESULTADOS	
1 <i>Distribución Geográfica</i>	20
2 <i>Análisis Genealógico</i>	22

- Características de las secuencias	22
- Variación genética poblacional	23
de <i>Grammostola anthracina</i>	
- Análisis filogenético	27
- Estructuración haplotípica	31
- Estructuración genética en relación	31
a los morfos	
<i>3 Carácter es morfológicos</i>	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO I	52
ANEXO II	54
ANEXO III	56
ANEXO IV	63

RESUMEN

La tarántula *Grammostola anthracina* es una de las arañas de mayor tamaño del Uruguay. Es la más longeva dentro de los arácnidos; sus ejemplares alcanzan a vivir más de 30 años y les toma 10 años llegar a la madurez sexual. Viven asociadas a serranías, en cuevas que construyen bajo piedras. Durante el período reproductivo el macho adulto abandona la cueva en busca de hembras. En Uruguay se pueden distinguir dos morfos, uno negro al norte del Río Negro y otro marrón-rojo distribuido al sur. Hasta el momento no se han encontrado sitios de coexistencia de ambos morfos. Aunque no se ha observado aislamiento copulatorio en el laboratorio, los estudios a nivel etológico evidencian diferencias entre los morfos en la duración de cópula y el número de inserciones palpares, existiendo así la posibilidad de que representen especies distintas. Esta tesis tuvo como objetivo dilucidar el estatus taxonómico de la especie nominal *G. anthracina*, mediante una metodología basada primariamente en árboles de genes, poniendo a prueba la hipótesis de que la especie nominal *G. anthracina* está constituida por más de una especie biológica alopátrica. Éste enfoque permite delimitar las especies como linajes históricos. Para ello se caracterizaron genéticamente individuos de 17 localidades de Uruguay, secuenciando la región de ADN mitocondrial *citocromo oxidasa sub-unidad I*. Se determinaron los haplotipos para cada localidad y se compararon los patrones de variación intra e interpoblacionales. A nivel geográfico se determinó la distribución del morfo negro principalmente sobre la cuesta basáltica y el marrón-rojo en el resto del país y a nivel morfológico se encontraron nuevos caracteres diagnósticos. En

conclusión la tesis permitió clarificar el estatus taxonómico de la especie nominal *G. anthracina*, encontrando que los morfos son especies diferentes. Estos resultados constituyen un aporte novedoso en el estudio de arañas de Uruguay, contribuyendo a su vez con la sistemática en general con el aporte de nuevos caracteres diagnósticos morfológicos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

ANTECEDENTES

La sistemática es la rama de la biología que identifica y agrupa a los organismos reflejando sus relaciones evolutivas, constituyendo así el marco teórico de referencia de toda la información biológica (Cracraft 2002). Las especies constituyen la unidad biológica básica en sistemática, fundamental para estudios de taxonomía, biogeografía, filogeografía, ecología, macroevolución, biodiversidad y conservación (Cracraft 2002, Oxbrough et al. 2005, Chang et al. 2007, Gjerde et al. 2007, Pétillon et al. 2008, Masta et al. 2009, Garb & Gillespie 2009, Bailey et al. 2010, De Busschere et al. 2010, Snowman & Zinger 2010, Kuntner & Agnarsson 2011, Rix & Harvey 2012). Existen muchos conceptos de especie (Coyne & Orr 2004) y la delimitación de especies en la naturaleza dista de ser sencilla (Cracraft 2002, Hey et al. 2003, Sites & Marshall 2004). Uno de los conceptos de especie más extendidos, al menos entre los zoólogos, es el concepto biológico de especie planteado por Mayr (1942, 1995). A partir del uso masivo de secuencias de ADN en estudios taxonómicos, los conceptos filogenéticos de especie (Baum & Donoghue 1995, Cracraft 1989, de Queiroz & Donoghue 1988, Shaw 1998) van tomando cada vez más importancia, mientras otros definen a las especies desde un enfoque genealógico (Baum & Shaw 1995, Fujita et al. 2012, Knowles & Carstens 2007). De todas formas, existe un consenso en que las especies equivalen a linajes poblacionales (de Queiroz 1999) y hay variadas formas de identificarlas o delimitarlas en la naturaleza, tomando a los conceptos de especies como herramientas “secundarias” para reconocer a

las especies (Wiens & Penkrot 2002, Sites & Marshall 2003, de Queiroz 2005, 2007). Para detectar estos linajes se pueden utilizar métodos no basados en árboles y métodos basados en árboles (Sites & Marshall 2003, 2004).

En las arañas, como en los restantes grupos animales, los caracteres morfológicos han sido utilizados tradicionalmente en la delimitación de especies (Bertani 2001). A pesar de ello, en algunos grupos éstos resultan insuficientes, lo que ha impulsado el desarrollo de estudios basados en evidencia molecular (e.g., Astrin et al. 2006, Bond & Stockman 2008, Bailey et al. 2010, Tanikawa et al. 2010, Hamilton et al. 2011, Dimitrov et al. 2012). Los datos moleculares proporcionan un considerable número de caracteres informativos, siendo el complemento ideal para realizar análisis filogenéticos. La selección de los marcadores moleculares para obtener los caracteres va a depender del nivel jerárquico del problema a estudiar. Para ello se considera la tasa de variación del gen (o región del ADN a secuenciar). Por ejemplo, para detectar polimorfismos y realizar estudios de parentesco se utilizan microsatélites (Ji et al. 2004, Da Silveira & Bonatto 2009), ya que estos marcadores detectan variación a nivel de individuos. A nivel poblacional o de especies cercanas el marcador genético *citocromo oxidasa subunidad I* del ADN mitocondrial (Barret & Hebert 2005) es uno de los más utilizados, incluyendo en el abordaje conocido como el código de barras de las especies (Hebert et al. 2003). Para realizar estudios a nivel de familias o infraórdenes se pueden utilizar, por ejemplo, marcadores de ADN nuclear ribosomal, como el 28S (Hedin & Bond 2006). Cualquiera sea el caso la tendencia de trabajo es utilizar sistemas multilocus (Hendrixon et al 2013, Keith & Hedin 2012, Salter et al. 2013) para reducir la

posibilidad de que el árbol de genes no coincida con el árbol de especies (Doyle 1992).

El género *Grammostola* Simon 1892 de la familia Theraphosidae es endémico de América del Sur. Las especies de *Grammostola* se caracterizan por tener baja vagilidad y gran longevidad. Durante toda su vida viven en cuevas bajo la tierra. Como en otras Theraphosidae, los juveniles y hembras adultas sólo salen para alimentarse y los machos adultos son los únicos que se dispersan en la época reproductiva en busca de hembras (Janowski-Bell & Horner 1999, Stoltzey & Shillington 2009). Los individuos tardan 10 años en llegar a la adultez y las hembras alcanzan a vivir más de 30 años (Criscuolo et al. 2010). Los trabajos taxonómicos que refieren a este género son escasos (Bücherl 1951, Ferretti et al. 2011, Schiapelli & Gerschman 1962, Raven 1985, Goloboff 1993, Peters 2000). A esto se suma la dificultad de trabajar con este género dado que sus caracteres morfológicos resultan ser poco variables, dificultando la delimitación y discriminación de especies (Bücherl 1957, Schiapelli & Gerschman 1979). En las grandes arañas terafósidas los caracteres morfológicos externos son muy conservados y por lo tanto poco informativos taxonómicamente (Raven 1985, Goloboff 1993, Hendrixon & Bond 2005); de esta forma una fracción importante de los caracteres específicos en arañas proviene de la morfología genital (Pérez-Miles et al. 1996, Bertani 2000). Sin embargo, dentro del género *Grammostola* estos caracteres resultan muy homogéneos, dificultando la delimitación y discriminación de especies (Bücherl 1957, Schiapelli & Gerschman 1979).

En el catálogo mundial de arañas (Platnick 2014), basado en publicaciones científicas, se reconocen 20 especies de *Grammostola*, citándose para Uruguay las siguientes cinco

especies: *G. acteon* (Pocock, 1903), *G. alticeps* (Pocock, 1903), *G. andreleetzi* (Vol, 2008), *G. anthracina* (Koch, 1842) y *G. grossa* (Ausserer, 1871). Sin embargo, el último trabajo realizado sobre las arañas migalomorfas de Uruguay, basado en datos de las colecciones uruguayas y observaciones de campo, confirma la presencia en el país de cuatro especies: *G. andreleetzi*, *G. anthracina*, *G. burzaquensis* y *G. iheringi* (Montes de Oca & Pérez-Miles 2009). El holotipo de *G. acteon* depositado en el British Museum (Natural History) pertenece a la localidad de Mornay, Brasil. Pérez-Miles (1985) indica que la cita de esta especie para Uruguay es incorrecta basado en la revisión del material estudiado por Bücherl (1951) el cual no incluía material procedente de Uruguay. *Grammostola grossa* y *G. alticeps* están citadas para Uruguay (Pérez-Miles 1985, Peters 2003), pero luego de varios años de muestreos realizados por especialistas no se ha encontrado nueva evidencia sobre la presencia de estas especies en el país. Esto podría reflejar: A) la extinción de estas especies en la naturaleza, o B) más probablemente una errónea identificación inicial de estos individuos (Pérez-Miles com. pers.).

Grammostola anthracina está citada para Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. En nuestro país está ampliamente distribuida en zonas pedregosas, localizándolas en cuevas bajo piedras. Presenta diferencias cromáticas (Figura 1); un morfo de color negro que se extiende al norte del río Negro y un morfo marrón-rojo que se distribuye al sur del mismo (Postiglioni & Costa 2006). Hasta el momento, según datos de colecciones y observaciones de campo, no se han encontrado sitios donde ambos morfos coexisten. Pérez-Miles (1988) analizó individuos de colecciones procedentes de Uruguay y

sur de Brasil, incluyendo probablemente individuos de ambos morfos (los ejemplares depositados en la colección pierden la coloración original, tomando una coloración homogénea oscura), no reportando discontinuidades morfológicas en caracteres somáticos ni genitales. Estudios comportamentales evidenciaron diferencias entre los morfos en relación a la duración de la cópula y en el número de inserciones (Costa & Pérez-Miles 2002, Postiglioni & Costa 2006). En estos trabajos



Figura 1. Ejemplares de *Grammostola anthracina*. A) morfo marrón-rojo, B) morfo negro.

no fue posible obtener descendencia entre morfos por lo que no se pudo verificar si realmente hubo inseminación y fertilización; sin embargo, este hecho podría sugerir que los morfos están aislados reproductivamente.

Recientemente *Grammostola anthracina* fue propuesta como sinónimo senior de *Grammostola mollicoma* (Ausserer 1875) por Fukushima et al. (2011). En dicho trabajo se examinaron los holotipos hembra de *Eurypelma anthracina* C. L. Koch 1842 y de *Eurypelma mollicomum* Ausserer 1875. El holotipo de *G. anthracina* se encuentra depositado en el British Museum of Natural History y procede de Montevideo, Uruguay. La descripción carece de datos confiables sobre la coloración de los individuos, pero a partir de la procedencia de recolecta se podría inferir que pertenece al morfo marrón-rojo (ver abajo).

EL PROBLEMA A ESTUDIAR

Grammostola anthracina, si bien está distribuida por todas las serranías del Uruguay, está amenazada por la pérdida del hábitat, tanto por urbanización, como ocurrió con la población del morfo marrón-rojo del Cerro de Montevideo, como por las plantaciones forestales, producción de energía y minería. Otra gran amenaza es el tráfico de mascotas; donde individuos de *G. anthracina* son extraídas de su medio para ser llevadas al mercado europeo (Costa & Pérez-Miles 2007). Esta tarántula es la más longeva dentro de los arácnidos, y sus individuos tardan muchos años en llegar a su madurez sexual, por lo que recuperar una población, tras la extracción de los individuos, puede ser muy lento o incluso pueden ocurrir extinciones locales fácilmente. Las diferencias comportamentales,

cromáticas y geográficas entre los morfos de *G. anthracina* presentes en Uruguay y la baja vagilidad de los individuos sugiere que éstos pueden representar especies diferentes. De esta forma, resulta necesario clarificar el estatus taxonómico de las poblaciones actualmente asignadas a la especie *G. anthracina* para delinear planes de conservación ajustados a la realidad biológica.

Para ello, primero se realizó un estudio exhaustivo de la distribución geográfica de cada morfo, buscando caracterizar los patrones de distribución e identificar alguna correlación con el ambiente. En segundo lugar se analizó un fragmento del genoma mitocondrial correspondiente a la *citocromo oxidasa sub unidad I* (COI) de individuos de 17 localidades diferentes. Este gen ha sido utilizado exitosamente para dilucidar el estatus de especies crípticas (e.g., Bond & Stockman 2008, Starret & Hedin 2007). Se han seleccionado caracteres del genoma mitocondrial, porque los genes mitocondriales carecen de intrones, no recombinan y tienen sólo herencia materna. De esta forma el tamaño poblacional efectivo del genoma mitocondrial es unas cuatro veces menor que el correspondiente al ADN genómico. En consecuencia, los haplotipos mitocondriales se fijan por deriva genética, en promedio, cuatro veces más rápido que aquellos de un gen autosómico (Brown et al. 1979, Avise 2000). Estas características son una ventaja para poder determinar relaciones intraespecíficas y/o de especies cercanamente emparentadas (Avise 2000) al minimizarse la posibilidad de hemiplasia (Avise & Robinson 2008). Se utilizó una metodología basada en árboles de genes para delimitar las especies como linajes históricos siguiendo el protocolo de Wiens & Penkrot (2002). En tercer lugar y debido a que pueden existir

diferencias entre el árbol de genes inferido y el de las poblaciones/especies en estudio se verificaron los análisis de ADN mitocondrial con el estudio de caracteres morfológicos. Para ello se buscó identificar nuevos caracteres diagnósticos, re-examinando la morfología externa de los morfos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La variación cromática, las diferencias comportamentales y la distribución geográfica observada a nivel interpoblacional en la especie nominal *Grammostola anthracina*, se debe a que ésta está constituida por más de una especie biológica.

Objetivo General

Dilucidar el estatus taxonómico de las poblaciones de *Grammostola anthracina* en Uruguay.

Objetivos Específicos

- 1 Determinar si el patrón de distribución geográfica de los morfos está correlacionado con la geomorfología del suelo.
- 2 Obtener una genealogía de alelos mitocondriales recobrados de individuos de los dos morfos.
- 3 Evaluar el grado de diferenciación genética intra e interpoblacional.
- 4 Estimar el grado de estructuración genética en relación a los morfos.
- 5 Identificar caracteres morfológicos diagnósticos, además del color, para cada morfo.

METODOLOGÍA

1 Distribución geográfica de los morfos

Se revisó la coloración (a través de la base de datos) de los individuos depositados en la colección de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay y de algunos ejemplares de procedencia conocida que son mantenidos vivos en el laboratorio de Etología, Ecología y Evolución del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay. Se georreferenciaron los sitios de recolecta de cada ejemplar. Para cada morfo se generó un mapa de distribución espacial con el programa DIVA-GIS (Hijmans et al. 2005) al cual se le agregó la capa de eco-regiones del Uruguay (Panario 1988). Con el programa STATISTICA (Weiβ 2007) se realizó una regresión logística para corroborar si existe asociación entre los morfos y las eco-regiones en las cuales se distribuyen.

2 Análisis genealógico

Diseño de muestreo

Se exploraron 26 zonas pedregosas de nuestro país durante los años 2011-2013. Las localidades seleccionadas para recolectar al morfo negro fueron: Arroyo Catalán, Sepulturas y Campamento (Artigas), Cuchilla de Mangrullo (Cerro Largo), Baygorria, Cuchilla de las Averías y del Navarro (Río Negro), Masoller y Cuchilla Negra (Rivera), Arerunguá y Daymán (Salto), Achar, Arerunguá y Valle Eden (Tacuarembó); para el morfo marrón-rojo: Cerros de San Juan y Nueva Palmira (Colonia),

Estancia el Timote (Flores), Cuchilla del Timote (Florida), Cuchilla de Polanco (Lavalleja), Pan de Azúcar (Maldonado), Cuchilla del Queguay (Paysandú), Cuchilla de Santa Ana y Puntas del Cuñapirú (Rivera), Cerro Picudo (Rocha), Sierra de Mahoma (San José) e Isla Patrulla (Treinta y Tres). Se encontraron y recolectaron 65 individuos en solo 17 localidades (comprendiendo 11 del morfo negro y 6 del morfo marrón-rojo) (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Localidades de colecta de los individuos de *Grammostola anthracina* empleados en este estudio. Las mismas se encuentran mapeadas en la Figura 2.

MORFO	ID	LOCALIDAD	DEPARTAMENTO	LATITUD	LONGITUD	# INDIVIDUOS
Negro	Mas	Masoller	Rivera	-31.0921	-56.0157	3
Negro	Sep	Sepulturas	Artigas	-30.8298	-56.0540	5
Negro	Art	Arroyo Catalán	Artigas	-30.8164	-56.3504	1
Negro	Bay	Baygorria	Río Negro	-32.8644	-56.8265	5
Negro	RNe	Cuchilla de Navarro	Río Negro	-32.6659	-57.0262	1
Negro	RNe	Cuchilla de Navarro	Río Negro	-31.4105	-57.0262	1
Negro	CNe	Cuchilla Negra	Rivera	-31.0737	-55.9761	3
Negro	CNe	Cuchilla Negra	Rivera	-30.9515	-55.6264	4
Negro	Are	Arerunguá	Salto	-31.4622	-56.7139	2
Negro	Day	Daymán	Salto	-31.4006	-57.6914	3
Negro	Ach	Achar	Tacuarembó	-32.3992	-56.1156	6
Negro	VaE	Valla Edén	Tacuarembó	-31.8167	-56.1667	5
Negro	Are	Arerunguá	Tacuarembó	-31.6437	-56.3057	3
Marón-rojo	TyT	Isla Patrulla	Treinta y Tres	-33.0594	-54.5428	5
Marón-rojo	CSJ	Cerro de San Juan	Colonia	-34.1872	-57.9272	6
Marón-rojo	NPa	Nueva Palmira	Colonia	-33.8499	-58.4115	1
Marón-rojo	Flo	Estancia El Timote	Flores	-33.8489	-56.9702	2
Marón-rojo	Lav	Cuchilla de Polanco	Lavalleja	-34.0237	-55.3048	4
Marón-rojo	PAZ	Pan de Azúcar	Maldonado	-34.6452	-55.2473	4

Para los árboles de genes (ver abajo) se secuenciaron ejemplares de *Grammostola andreleetzi* (Uruguay), *Grammostola burzaquensis* (Uruguay), *Grammostola pulchra* (Brasil) y *Grammostola rosea* (Chile). Todos los ejemplares están depositados en la colección de Entomología de la Facultad de Ciencias fijados en etanol 95%. También se incluyeron secuencias de la familia Theraphosidae obtenidas de

GenBank de *Aphonopelma seemanni* y *Eupalaestrus campestratus* (Theraphosinae) (JN0181241, JQ412446), *Chilobrachys huahini* y *Coremiocnemis cunicularia* (Selenoscomiinae) (JN018125, JN018198) enraizando con haplotipos de la subfamilia Ornithoctoninae: *Cyriopagopus schoedtei*, *Haplopelma schmidti* (JN018126, AY309259, JN018127).

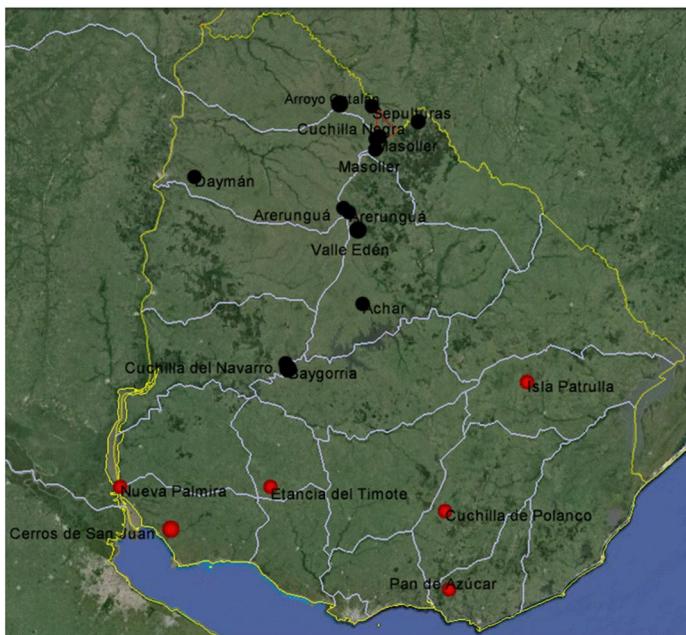


Figura 2. Ubicación de las localidades de recolección de los individuos de *Grammostola anthracina* empleados en este estudio. Los colores rojo y negro corresponden con la coloración de los morfos colectados en cada localidad.

Obtención de secuencias de ADN

El ADN se obtuvo del músculo de una de las pata IV de cada individuo usando el kit DNeasy blood and tissue de Quiagen y

el protocolo de extracción de Medrano et al. (1990) (Anexos I y II respectivamente). La concentración de ADN extraído fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 1000). Para amplificar el fragmento mitocondrial COI se utilizaron los oligonucleótidos: LCOI 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCOI 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') diseñados por Folmer et al. (1994), siguiendo las condiciones brindadas por Peterson et al. (2006). Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en Macrogen Inc. (Corea).

Alineamiento, diversidad molecular y reconstrucción filogenética

La edición de las secuencias se realizó con el programa PROSEQ v3 (Filatov 2002) y la alineación con el programa Clustal X usando los valores por defecto de los parámetros de alineación (Thompson et al. 1997). Se estimaron porcentajes de divergencia genética observada (distancia p) entre pares de haplotipos, poblaciones y clados (ver abajo) con MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011).

La genealogía de haplotipos se reconstruyó en base a tres métodos, Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Los análisis de MP se realizaron con el programa TNT (Goloboff et al. 2003) a partir de 1000 réplicas utilizando el algoritmo de intercambio de ramas TBR reteniendo 5 árboles por réplica. Se utilizaron pesos implícitos con constantes de concavidad $K=15-25-35-45$. El soporte de los clados fue evaluado a través de Jackknife (Farris et al. 1996). El índice de consistencia (IC) y el índice de retención (IR) fueron calculados con Winclada v.1.0.8 (Nixon 2002).

La inferencia filogenética por MV se implementó en el programa PhyML V 3.0 (Guidon & Gascuel 2003) a través del sitio Phylogeny.fr (Dereeper et al. 2008). Se utilizó el modelo de sustitución GTR+I+G seleccionado con ModelTest V.2.1 (Posada & Crandall 1998) a partir del criterio AIC₂ y BIC con 4 categorías de tasa de sustitución, el apoyo de los nodos se evaluó con 500 réplicas de Bootstrap (Felsenstein 1985). El análisis de IB se realizó con el programa Beast 1.8.0 (Drummond et al. 2012) utilizando también el modelo de sustitución GTR+I+G, mediante 3 corridas independientes de 60 millones de generaciones guardando parámetros y árboles cada 10000 generaciones. Se utilizó el programa TRACER v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) para asegurarse que las cadenas de Markov alcanzaran la estacionalidad y determinar descartar el primer 15% de los datos como *burn-in*. Se obtuvo un tamaño de muestra efectivo (ESS) mayor a 200 para todos los parámetros. Se construyó el clado de mayor credibilidad utilizando el programa TreeAnnotator V 1.8.0 (Rambaut & Drummond 2007).

Para la detección de linajes basados en metodologías de árboles se utilizó el método desarrollado por Wiens & Penkrot (2002) (Fig. 3). Aquí se asume que no existe flujo génico entre la especie focal de estudio y una o más especies cercanamente relacionadas y además existen caracteres morfológicos diagnósticos y congruencia geográfica. Una vez obtenida la genealogía de haplotipos, se observa si la especie focal presenta haplotipos exclusivos o no. Si los haplotipos de la especie focal son exclusivos, la presencia de especies múltiples encubiertas por la taxonomía previa, estaría insinuado por clados (linajes de especies) bien soportados que a su vez concuerdan geográficamente (Fig. 3a). La presencia de una única especie (Fig. 3b) está sugerida por la evidencia de

flujo génico entre clados, como sería el caso de la presencia de haplotipos de determinada localidad en ambos clados y/o haya una discordancia entre la filogenia y geografía del haplotipo. Si los haplotipos de la especie focal no son exclusivos (la especie focal es parafilética o polifilética) respecto a una o más especies que son diferentes y exclusivas, la especie focal representaría a múltiple especies si no hay evidencia de flujo génico entre clados (Fig. 3c). Si hay flujo génico entre los clados (Fig. 3d), la especie focal será una sola especie no exclusiva (como si las entidades fuesen parafiléticas). Si la especie focal no es exclusiva respecto a otra especie que tampoco es exclusiva (los haplotipos de la especie focal se intercala con los haplotipos de otra especie), y no hay evidencia de flujo génico entre los clados de cada especie, entonces la especie focal y la otra especie podrán representar múltiples especies enmascaradas por la taxonomía tradicional (Fig. 3e). Alternativamente, la especie focal y las otras especies pueden ser coespecíficas si existe evidencia de un fuerte flujo génico entre ellas (Fig. 3f).

Como una forma adicional de visualizar las relaciones genealógicas entre las variantes haplotípicas encontradas se construyó una red haplotípica mediante el algoritmo MJ (Bandelt et al. 1999) con el programa Network (fluxus-engineering.com).

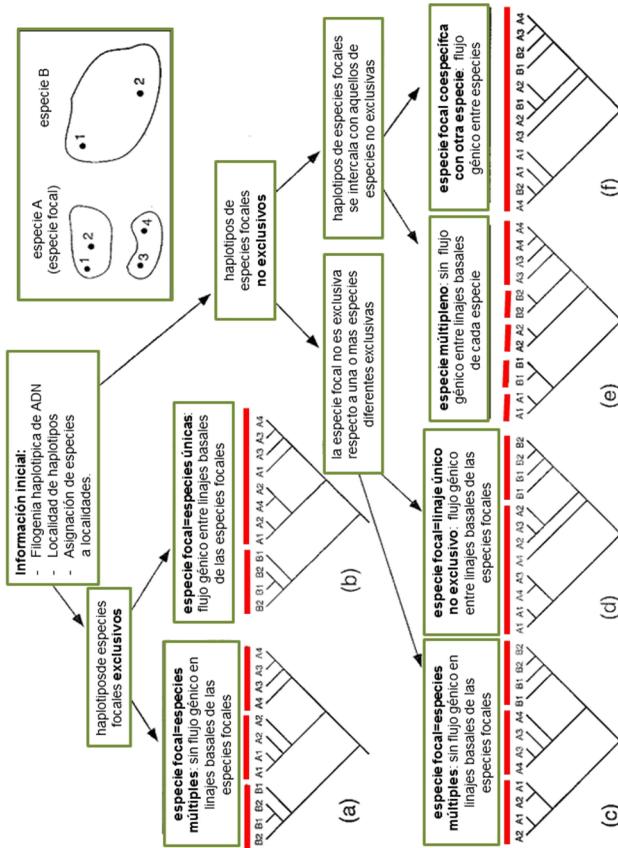


Figura 3. Diagrama de flujo simplificado para la delimitación de especies basado en filogenias de haplotipos de ADN; ilustrado con un ejemplo hipotético. La línea roja sobre los taxones terminales indica el límite de la especie (modificado de Wiens y Penkrot 2002).

Estructura y diversidad genética y demografía

Para cuantificar el grado de estructuración geográfica de la variación genética se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al. 1992) implementados en el programa ARLEQUIN V 3.5 (Excoffier et al. 2010), donde los haplotipos fueron agrupados por localidad de colecta y morfo. Con este programa también se calcularon índices estándares de diversidad molecular, incluyendo la diversidad nucleotídica π (Nei 1978). Por último, como una aproximación a la demografía reciente de la especie se usaron pruebas de apartamiento de la neutralidad de Tajima (D , Tajima 1989) y de Fu (F_s , Fu 1997) utilizando el programa ARLEQUIN V 3.5 (Excoffier et al. 2010).

3 Caracteres morfológicos

Se revisaron 6 ejemplares de *G. anthracina* morfo negro, 6 de *G. anthracina* morfo marrón-rojo, 2 de *G. burzaquensis*, 4 de *G. iheringi*, 2 de *G. rosea* y 2 de *G. pulchra* depositados en la colección de Entomología de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. Como se mencionó antes, en arañas una fracción importante de caracteres sistemáticos específicos proviene de la morfología genital (Pérez-Miles et al. 1996, Bertani 2000); en este trabajo se realizó la búsqueda de caracteres diagnósticos focalizándose en los caracteres sexuales secundarios de los machos. Para ello se observaron los bulbos y apófisis tibiales utilizando una lupa binocular Olympus SZH.

RESULTADOS

1 Distribución geográfica de los morfos

Los datos de colecciones y los trabajos de campo indican que el morfo negro está distribuido en el norte de Uruguay, mientras que el morfo marrón-rojo tiene una distribución en el sur, extendiéndose hacia el norte por el litoral hasta Paysandú y por el oeste siguiendo la zona de la Cuchilla de Santa Ana (Fig. 4). Se han encontrado dos zonas en los cuales se registraron ambos morfos en proximidad. En zona de Queguay (Paysandú) ambos morfos están separados por aproximadamente 14 km. El morfo marrón-rojo procedente de esta área está representando por un individuo de colección recolectado en sobre la Ruta 3 (Queguay) en el año 2010, el cual no se pudo secuenciar; en nuevas búsquedas a campo no conseguimos ejemplares de esa localidad, pero si logramos recolectar individuos del morfo negro sobre la Ruta 26 (Queguay). En la segunda área, más al norte, donde se une la Cuchilla de Santa Ana con la Cuchilla Negra, los dos morfos se encuentran separados por aproximadamente 7 km. En el campo se pudo verificar la presencia del morfo negro en la Cuchilla Negra, pero no se pudieron conseguir ejemplares vivos del morfo marrón-rojo en la localidad Cuchilla de Santa Ana, donde se encontraron en 2001. Esta zona está muy modificada, presentando un suelo completamente desnudo. Los resultados obtenidos, a partir de la regresión logística entre los morfos y las eco-regiones en donde se encuentran, indican que el morfo negro está asociado a la cuesta basáltica y el morfo marrón-rojo está presente en el Graven de la Laguna Merín, Santa

Lucía y en las Sierras del Este ($\chi^2 = 49.37$, $p < 0.01$). Las cuencas sedimentarias que comparten ambos morfos son la Gondwánica y la del Oeste (Fig. 4).

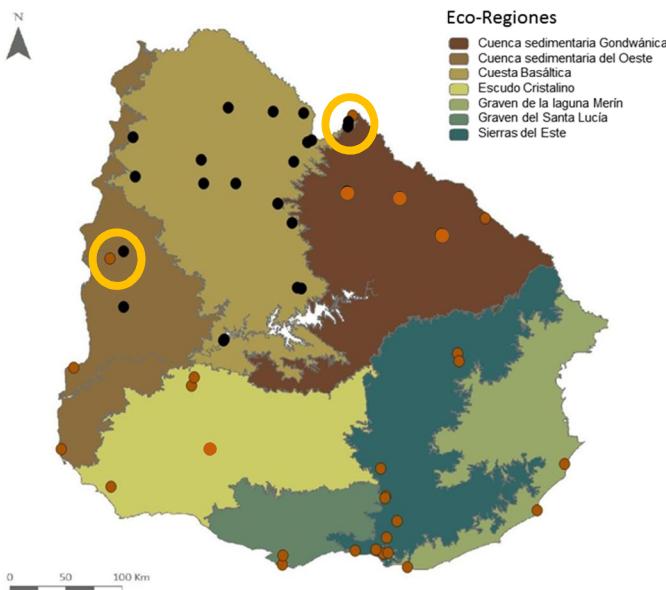


Figura 4. Localidades de registro de *Grammostola anthracina* en Uruguay; se indican las diferentes eco-regiones del país. En naranja se representa el morfo marrón-rojo y en negro el morfo negro. Los círculos señalan las áreas en donde ambos morfos se encuentran más cercanos.

2 Análisis genealógico

Características de las secuencias

Se obtuvieron 79 secuencias del gen mitocondrial COI, 65 pertenecientes a *G. anthracina* (22 del morfo marrón-rojo y 43 del morfo negro), 1 de *G. burzaquensis*, 1 de *G. andreleetzi*, 7 de *G. pulchra* y 5 de individuos de *G. rosea*. El alineamiento producido (incorporando las 7 secuencias de GenBank) constó de una longitud de 568 pares de bases (ANEXO III). Las secuencias presentaron 343 sitios conservados, 225 sitios variables, de los cuales 181 son parsimoniosamente informativos. El contenido de G+C fue 0.338 % (de un total de 253 sitios totales, excluyendo “gaps” y datos faltantes). Se recuperaron 50 haplotipos con una elevada diversidad haplotípica total ($H_d = 0.978$) y una diversidad nucleotídica $\pi = 0.086$. Al limitar la estimación de los índices a las secuencias de ambos morfos de *Grammostola anthracina* la diversidad total haplotípica es mayor ($H_d = 0.979$) y la diversidad nucleotídica menor ($\pi = 0.067$). La diversidad nucleotídica para los morfos negro y marrón-rojo fue 0.053 y 0.014 respectivamente. Las distancias genéticas observadas entre haplotipos de una especie y en comparaciones pareadas entre especies del género *Grammostola* se pueden observar en la Tabla 2. La diferencia genética entre los morfos negro y marrón de *G. anthracina* es de 10.3%. La menor distancia genética encontrada entre diferentes especies fue del 10% para la comparación del morfo marrón-rojo de *G. anthracina* y *G. burzaquensis*.

Tabla 2. Distancias (distancia-p) intra e interespecíficas observadas para especies del género *Grammostola*.

DISTANCIA GENÉTICA ENTRE GRUPOS	<i>G. anthracina</i> negra	<i>G. anthracina</i> marrón-roja	<i>G. rosea</i>	<i>G. pulchra</i>	<i>G. burzaquensis</i>
<i>G. anthracina</i> negra	-	-	-	-	-
<i>G. anthracina</i> marrón-roja	0.103	-	-	-	-
<i>G. rosea</i>	0.113	0.116	-	-	-
<i>G. pulchra</i>	0.102	0.107	0.112	-	-
<i>G. burzaquensis</i>	0.109	0.100	0.126	0.105	-
<i>G. andreleetzi</i>	0.137	0.146	0.129	0.150	0.135
DISTANCIA GENÉTICA DENTRO DEL GRUPO	0.0554	0.013	0.0129	0.0431	

Variación genética poblacional de *Grammostola anthracina*

Dentro de las 65 secuencias de *G. anthracina* se identificaron 42 haplotipos (ANEXO IV), 28 para el morfo negro y 14 para el morfo marrón-rojo (Tabla 3). Los morfos muestran gran estructuración geográfica; en la mayoría de los casos, cada localidad estudiada presenta un único conjunto de haplotipos. Las localidades que compartieron haplotipos correspondieron a: morfo marrón-rojo: I) Cerro la Espuelita en Flores y Cerros de San Juan en Colonia (haplotipo 3), II) Isla Patrulla en Treinta y Tres y Cerro Pan de Azúcar en Maldonado (haplotipo 5); y morfo negro: III) Cuchilla de Navarro en Río Negro y Arerunguá en Tacuarembó (haplotipo 12), IV) Masoller en Rivera y Arroyo Catalán (Ruta 30) en Artigas (haplotipo 27). Los 5 individuos de la localidad de Valle Eden (Tacuarembó) presentaron un único haplotipo (34).

La diferenciación genética dentro de cada localidad fue más baja para las poblaciones del morfo marrón-rojo (0.33%) que para el morfo negro (2.3%). Las distancias genéticas calculadas entre pares de localidades muestran una baja

diferenciación dentro de las poblaciones pertenecientes a un mismo morfo. Para el morfo marrón-rojo, los pares de localidades que presentaron el valor más alto fueron los constituidos por Nueva Palmira (Colonia) - Pan de Azúcar (Maldonado) y Nueva Palmira (Colonia) - Cuchilla de Polanco (Lavalleja) con una divergencia del 2.9% y 3.1% respectivamente. La variación genética promedio observada entre haplotipos del morfo marrón-rojo es 1.29%. En el morfo negro el par de localidades que presentaron una mayor divergencia genética fueron: Sepulturas (Artigas) - Valle Edén (Tacuarembó), Sepulturas (Artigas) - Arerunguá (Salto/Tacuarembó), Sepulturas (Artigas) - Baygorria (Río Negro) y Sepulturas (Artigas) - Achar (Rivera) con una divergencia del 8.7 - 8.7 - 8.8 y 8.9% respectivamente. La variación genética promedio observada entre haplotipos del morfo negro fue de 5.54%. Cuando se calcula la distancia entre pares de localidades de diferentes morfos, la distancia genética varía entre 7.7 y 12.1%; cuando se excluye de estas comparaciones a la localidad de Arroyo Catalán (Ruta 30, Artigas) el valor mínimo observado es 9.6% (Tabla 4). Cuando se comparan los morfos de *G. anthracina* con las otras especies del género se observa la menor divergencia para el par *G. anthracina* morfo marrón-rojo y *G. burzaquensis* (10%) y la mayor divergencia para el par *G. anthracina* morfo marrón-rojo y *G. andreleetzi* (14.6%). La comparación interespecífica que mostró el mayor valor (15%) correspondió al par *G. pulchra* (Brasil) y *G. andreleetzi* (Uruguay) (Tabla 2).

Tabla 3. Haplótipos identificados para las diferentes localidades.

MORFO	DEPARTAMENTO	LOCALIDAD	HAPLOTIPO	ID	LATITUD	LONGITUD	MORFO	DEPARTAMENTO	LOCALIDAD	HAPLOTIPO	ID	LATITUD	LONGITUD
Negro	Río Negro	Cuchilla del Navarro	1	RNe	-32.666	-57.026	Negro	Río Negro	Bayorina	19	Bay	-32.884	-56.827
Negro	Saito	Daryan	2	Dw	-34.141	-57.051	Negro	Río Negro	Bayorina	20	Bav	-32.884	-56.827
Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	3	CSj	-34.187	-57.327	Negro	Tacuarembó	Aitar	21	Artb	-32.739	-56.115
Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	3	CSj	-34.187	-57.327	Negro	Rivera	Cuchilla Negra	22	CNe	-31.074	-55.076
Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	3	CSj	-34.187	-57.327	Marion-rojo	Lavalleja	Cuchilla de Pilánco	23	Lav	-34.024	-55.305
Marion-rojo	Flores	Estancia del Tmote	4	Flo	-33.949	-56.970	Negro	Tacuarembó	Arenguá	24	ArE	-31.644	-56.306
Marion-rojo	Flores	Estancia del Tmote	4	Flo	-33.949	-56.970	Negro	Tacuarembó	Arenguá	24	ArE	-31.644	-56.306
Negro	Saito	Arenguá	4	Are	-34.462	-56.744	Negro	Saito	Saito	25	ArE	-31.462	-56.744
Marion-rojo	Malónedo	Malónedo	5	Paz	-34.645	-55.447	Negro	Rivera	Cuchilla Negra	26	CNe	-30.951	-55.226
Marion-rojo	Isla Parodia	Isla Parodia	5	Tyt	-33.059	-54.445	Negro	Rivera	Macoller	27	Maris	-31.052	-56.018
Marion-rojo	Trenta y Tres	Isla Parodia	5	Tyt	-33.059	-54.445	Negro	Artigas	Arroyo Catilán	28	Art	-30.836	-56.550
Marion-rojo	Trenta y Tres	Isla Parodia	5	Tyt	-33.059	-54.445	Marion-rojo	Colonia	Nueva Palma	28	NPa	-33.850	-58.412
Marion-rojo	Trenta y Tres	Isla Parodia	5	Tyt	-33.059	-54.445	Negro	Rivera	Cuchilla Negra	29	CNe	-31.074	-55.076
Negro	Artigas	Septulturas	6	Sap	-30.030	-56.054	Negro	Rivera	Cuchilla Negra	29	CNe	-31.074	-55.076
Negro	Tacuarembó	Achar	7	Ach	-32.599	-56.216	Negro	Saito	Doyman	30	Dav	-31.461	-57.051
Negro	Tacuarembó	Achar	7	Ach	-32.599	-56.216	Negro	Rivera	Cuchilla Negra	31	CNe	-30.951	-55.226
Negro	Río Negro	Bayorina	8	Bav	-32.864	-56.827	Marion-rojo	Malónedo	Pan de Azúcar	32	PAz	-34.645	-55.447
Negro	Río Negro	Bayorina	8	Bav	-32.864	-56.827	Negro	Río Negro	Bayorina	33	Bav	-32.884	-56.827
Negro	Artigas	Septulturas	9	Sap	-30.830	-56.054	Negro	Tacuarembó	Valle Edén	34	VdE	-31.817	-56.167
Negro	Artigas	Septulturas	9	Sap	-30.830	-56.054	Negro	Tacuarembó	Valle Edén	34	VdE	-31.817	-56.167
Marion-rojo	Lavalleja	Cuchilla de Polanco	10	Lav	-34.024	-55.505	Negro	Tacuarembó	Valle Edén	34	VdE	-31.817	-56.167
Marion-rojo	Lavalleja	Cuchilla de Polanco	10	Lav	-34.024	-55.505	Negro	Tacuarembó	Valle Edén	34	VdE	-31.817	-56.167
Marion-rojo	Lavalleja	Cuchilla de Polanco	11	Lav	-34.024	-55.505	Negro	Tacuarembó	Valle Edén	34	VdE	-31.817	-56.167
Negro	Tacuarembó	Arenguá	12	Are	-33.643	-56.004	Negro	Artigas	Septulturas	35	Sep	-30.830	-56.054
Negro	Río Negro	Cuchilla de Navarro	12	RNe	-33.141	-57.026	Marion-rojo	Malónedo	Pan de Azúcar	36	PAz	-34.645	-55.447
Negro	Rivera	Cuchilla Negra	13	CNe	-30.951	-55.226	Negro	Artigas	Septulturas	37	SeP	-30.950	-56.054
Marion-rojo	Trenta y Tres	Isla Parodia	14	Tyt	-33.059	-54.445	Negro	Rivera	Macoller	38	Maris	-31.052	-56.018
Negro	Rivera	Cuchilla Negra	15	CNe	-30.951	-55.226	Negro	Rivera	Macoller	39	Maris	-31.052	-56.018
Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	16	CSj	-34.187	-57.327	Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	40	CSj	-34.187	-57.327
Marion-rojo	Malónedo	Pan de Azúcar	17	Paz	-34.645	-55.447	Negro	Saito	Doyman	41	Dav	-31.461	-57.051
Negro	Tacuarembó	Achar	18	Ach	-32.599	-56.216	Marion-rojo	Colonia	Cerro de San Juan	42	CSj	-34.187	-57.327
Negro	Tacuarembó	Achar	18	Ach	-32.599	-56.216							

Tabla 4. Distancia genética promedio observada entre localidades de *Grammostola anthracina*. Las localidades en cursiva representan a los individuos del morfo marrón-rojo. En color rojo se resaltan valores bajos obtenidos en comparaciones entre morfos.

LOCALIDAD	LOCALIDAD	DG	LOCALIDAD	LOCALIDAD	DG	LOCALIDAD	LOCALIDAD	DG
<i>Estación del Trío</i>	<i>Cerro de San Juan</i>	0.001	Achar	Baygorria	0.044	Arenuria	Sebuluras	0.087
<i>Isla Pátrula</i>	<i>Pan de Azúcar</i>		Dáman	Valle Edén	0.045	Sebuluras	Baygorria	0.088
<i>Isla Pátrula</i>	<i>Cuchilla de Póanco</i>	0.006	Masoller	Valle Edén	0.046	Sebuluras	Achar	0.105
<i>Estación del Trío</i>	<i>Nieve Pátrula</i>		Cuchilla de Navarro	Baygorria	0.047	Cuchilla de Póanco	Valle Edén	0.086
<i>Cuchilla de Póanco</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.010	Arenuria	Baygorria	0.049	<i>Pan de Azúcar</i>	Achar	0.105
<i>Cerro de San Juan</i>	<i>Nieve Pátrula</i>	0.011	Dáman	Masoller	0.050	<i>Isla Pátrula</i>	Valle Edén	0.096
<i>Estación del Trío</i>	<i>Isla Pátrula</i>	0.016	Cuchilla Negra	Arroyo Catán	0.050	<i>Cuchilla de Póanco</i>	Arenuria	0.097
<i>Isla Pátrula</i>	<i>Cerro de San Juan</i>	0.016	Baygorria	Masoller	0.054	Sebuluras	Sebuluras	0.097
<i>Estación del Trío</i>	<i>Cuchilla de Póanco</i>	0.020	Cuchilla de Navarro	Dayman	0.055	<i>Isla Pátrula</i>	Arroyo Catán	0.097
<i>Arroyo Catán</i>	<i>Masoller</i>	0.020	Dáman	Baygorria	0.056	<i>Cuchilla de Póanco</i>	Masoller	0.097
<i>Cuchilla de Póanco</i>	<i>Cerro de San Juan</i>	0.021	Achar	Valle Edén	0.057	<i>Pan de Azúcar</i>	Valle Edén	0.098
<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Valle Edén</i>	0.022	Sebuluras	Masoller	0.057	<i>Estación del Trío</i>	Valle Edén	0.098
<i>Cerro de San Juan</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.022	Arenuria	Achar	0.057	<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.098
<i>Estación del Trío</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.025	Cuchilla de Navarro	Achar	0.058	<i>Estación del Trío</i>	<i>Cuchilla Negra</i>	0.098
<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Arroyo Catán</i>	0.025	Achar	Arroyo Catán	0.059	<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.098
<i>Arroyo Catán</i>	<i>Valle Edén</i>	0.027	Dáman	Achar	0.060	<i>Pan de Azúcar</i>	Masoller	0.099
<i>Isla Pátrula</i>	<i>Nieve Pátrula</i>	0.027	Achar	Sebuluras	0.066	<i>Pan de Azúcar</i>	Dayman	0.099
<i>Sebuluras</i>	<i>Cuchilla Negra</i>	0.028	Arroyo Catán	Valle Edén	0.068	<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Cuchilla de Póanco</i>	0.099
<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Baygorria</i>	0.029	Cuchilla Negra	Achar	0.071	<i>Isla Pátrula</i>	Achar	0.099
<i>Pan de Azúcar</i>	<i>Nieve Pátrula</i>	0.029	Cuchilla Negra	Arroyo Catán	0.073	<i>Estación del Trío</i>	Arroyo Catán	0.099
<i>Cuchilla de Póanco</i>	<i>Nieve Pátrula</i>	0.031	Arenuria	Cuchilla Negra	0.075	<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Isla Pátrula</i>	0.100
<i>Arenuria</i>	<i>Arroyo Catán</i>	0.036	Cuchilla de Navarro	Cuchilla Negra	0.076	<i>Cerro de San Juan</i>	Arroyo Catán	0.100
<i>Dayman</i>	<i>Arenuria</i>	0.037	<i>Cuchilla de Póanco</i>	Arroyo Catán	0.077	<i>Cuchilla Negra</i>	Dayman	0.100
<i>Arenuria</i>	<i>Valle Edén</i>	0.038	Baygorria	Cuchilla Negra	0.077	<i>Estación del Trío</i>	<i>Cuchilla Negra</i>	0.102
<i>Baygorria</i>	<i>Valle Edén</i>	0.038	Dáman	Cuchilla Negra	0.077	<i>Pan de Azúcar</i>	Baygorria	<i>Nieve Pátrula</i>
<i>Baygorria</i>	<i>Arroyo Catán</i>	0.038	<i>Isla Pátrula</i>	Arroyo Catán	0.080	<i>Cuchilla de Póanco</i>	Cuchilla Negra	0.103
<i>Cuchilla de Navarro</i>	<i>Arenuria</i>	0.040	Dáman	Sebuluras	0.082	Achar	Sebuluras	0.103
<i>Cuchilla Negra</i>	<i>Masoller</i>	0.041	Cuchilla de Navarro	Arribana	0.084	<i>Cuchilla Negra</i>	<i>Pan de Azúcar</i>	0.104
<i>Valle Edén</i>	<i>Masoller</i>	0.042	Pan de Azúcar	Arroyo Catán	0.085	<i>Cerro de San Juan</i>	Dayman	0.104
<i>Dayman</i>	<i>Arroyo Catán</i>	0.042	Sebuluras	Valle Edén	0.087	<i>Isla Pátrula</i>	Baygorria	0.105

Análisis filogenético

A través del análisis de máxima parsimonia (MP) se obtuvieron 3 árboles ($C_i = 32$, $R_i = 79$) de 1713 pasos ($K = 25$). La filogenia obtenida por máxima verosimilitud (MV), registró un valor de log-verosimilitud = -3605.07963. En la reconstrucción filogenética a partir de inferencia Bayesiana (IB) se obtuvo un árbol MCC a partir de la compilación y anotación de 15305 árboles post burn-in de los cuales se identificaron 1299 clados únicos (log clado de mayor credibilidad = -47.0689). Las topologías de los árboles basados en los análisis de MP (Fig. 5), MV (Fig. 6) e IB (Fig. 7) fueron congruentes. Los tres métodos de inferencia filogenética recuperan la monofilia de los representantes de *Grammostola* (JK: <50, BML: 0.69, PP: 0.99) y de los grupos de morfo negro (JK: <50, BML: 0.56, PP: 0.96) y marrón-rojo (JK: 100, BML: 0.59, PP: 0.82). Los dos morfos de *G. anthracina* no resultaron hermanos. En los tres métodos el morfo negro se resolvió como grupo hermano de *Grammostola pulchra*, y estos a su vez como grupo hermano de *Grammostola burzaquensis* con MV (BML = 0.83). Sin embargo con MP e IB (JK < 50 PP = 0.82) *G. burzaquensis* resultó grupo hermano del clado que conforma el morfo marrón-rojo. Según los análisis de MP, MV e IB el clado correspondiente al morfo negro (N), se puede subdividir en tres grupos que contienen a los haplotipos de distintas localidades: N1a) Arerunguá (Salto y Tacuarembó), Arroyo Catalán (Artigas), Masoller (Rivera), Cuchilla de Navarro y Baygorria (Río Negro), Valle Edén (Tacuarembó); N1b): Achar (Tacuarembó), Arerunguá (Salto), Baygorria (Río Negro) y Daymán (Salto); y N2 con las localidades de Cuchilla Negra y Masoller (Rivera) y Sepulturas (Artigas). Aun así las poblaciones no son alopátridas. Según los análisis de MV e IB el clado del morfo marrón-rojo (R) puede

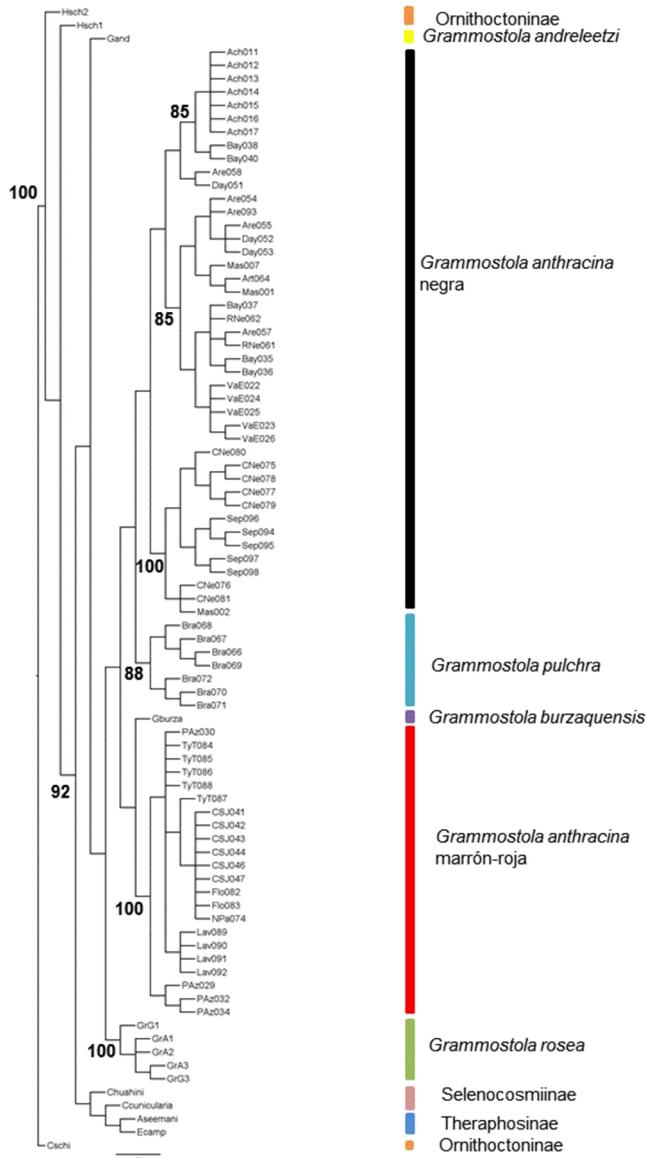


Figura 5. Árbol de consenso estricto (3 árboles de 1713 pasos; Ci = 32, Ri = 79, K = 25) obtenido a partir del criterio de máxima parsimonia. Los números corresponden a proporciones de Jackknife de nodos a la derecha.

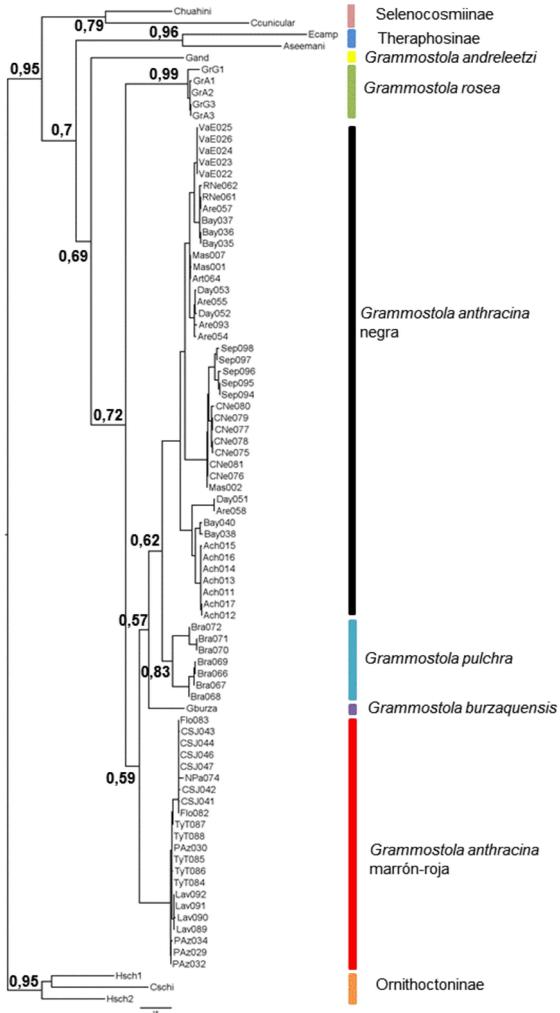


Figura 6. Reconstrucción filogenética mediante máxima verosimilitud (log-verosimilitud = -3605.079) de *Grammostola anthracina*. Los números son los valores de Bootstrap correspondientes a los nodos a la derecha; solo se muestran valores para los nodos principales y por encima de 50%.

dividirse en dos sub clados con individuos de distintas localidades: R1) Cerros de San Juan y Nueva Palmira (Colonia),

Espuelitas (Flores); y R2) Isla Patrulla (Treinta y Tres) Pan de Azúcar (Maldonado) y Cuchilla del Navarro (Lavalleja).

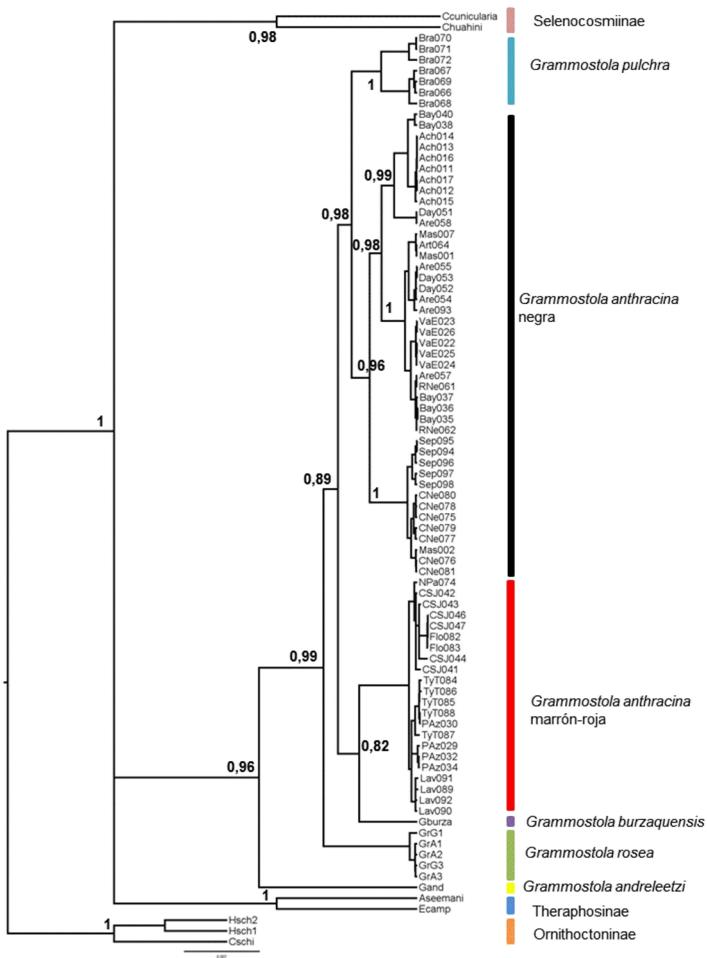


Figura 7. Árbol consenso (mayor credibilidad de clados) obtenido mediante inferencia Bayesiana de haplotipos de *Grammostola*. Los números corresponden a los valores de probabilidad posterior de los nodos (a la derecha); solo se muestran valores para los nodos principales.

Se pudo observar que cada morfo presentó haplotipos exclusivos y las reconstrucciones filogenéticas recuperaron a cada morfo como grupos monofiléticos, por lo que siguiendo la metodología de Wiens y Penkrot (2002) podemos inferir que los morfos negro y marrón-rojo de *G. anthracina* son dos especies.

Estructuración haplotípica

La construcción de la red de haplotipos, refleja una gran diferenciación entre los dos morfos (Fig. 8). Los haplotipos del morfo negro forman tres grupos. Si bien hay una tendencia a la segregación espacial de estos grupos, ninguno es completamente alopátrido de los otros dos. A su vez, al interior del grupo marrón-rojo se identifican dos grupos de haplotipos similares entre sí y segregados geográficamente; uno correspondiente a los haplotipos de las localidades del sur este (Nueva Palmira, Cerros de San Juan y Estancia del Timote) y otro a las localidades del sur oeste (Pan de Azúcar, Isla Patrulla y Cuchilla de Polanco).

Estructuración genética en relación a los morfos

Las diferencias entre morfos dan cuenta del 56.23% de la variación total de la muestra estudiada de *Grammostola anthracina*. La variación entre las localidades de cada morfo explican el 29.74% de la variación total y la variación interpoblacional del 14.03% restante (Tabla 5). Los test de Neutralidad de Tajima realizados separadamente para los morfos negro y marrón-rojo (Tabla 6) sugieren una posible expansión demográfica para el morfo marrón-rojo ($D = -1.734$, $p < 0.05$). Sin embargo, la prueba de Fu aunque arroja valores negativos éstos no son significativos.

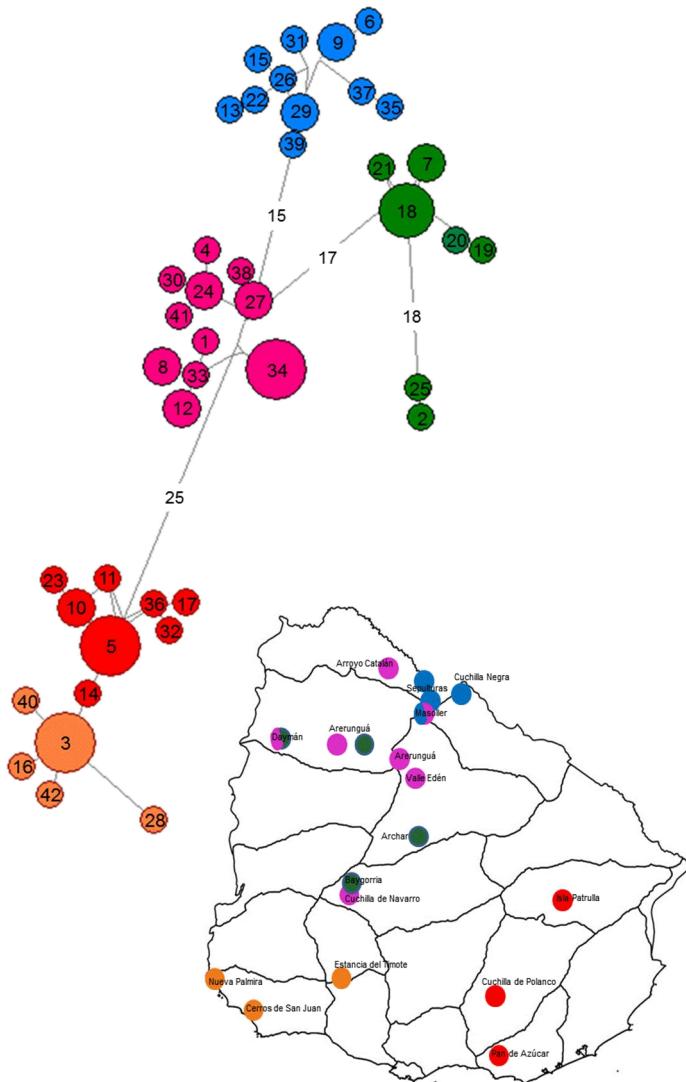


Figura 8. Red de haplotipos. Dentro de los círculos se indica el número de haplotipo. El número de mutaciones está indicado en las ramas. En rojo y naranja se representan los haplotipos correspondientes a los morfos marrón-rojo; en rosa, azul y verde los haplotipos correspondientes a los morfos negros. En el mapa, se puede observar la distribución de los haplotipos.

Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la diversidad genética de *Grammostola anthracina*. F_{CT} : coeficiente de diferenciación genética entre grupos, F_{SC} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones dentro de los grupos, F_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones. **: p<0.001

FUENTE DE VARIACIÓN	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	ÍNDICE DE FIJACIÓN
Entre grupos	56,23	$F_{CT} = 0,56232^{**}$
Entre las poblaciones dentro los grupos	29,74	$F_{SC} = 0,67952^{**}$
Dentro de las Poblaciones	14,03	$F_{ST} = 0,85973^{**}$

Tabla 6. Test de Neutralidad para cada morfo. **: p<0.05

	<i>Grammostola anthracina</i> morfo negro	<i>Grammostola anthracina</i> morfo marrón-rojo
Tajima	1,20213 p=0,899	-1,73465 p=0,021**
Fu	-2,71745 p=0,18	-1,11295 p=0,344

3 Caracteres morfológicos

Ambos morfos de *G. anthracina* difieren en la morfología de sus apófisis tibiales a la vez que difieren en esta estructura de *G. burzaquensis*, *G. iheringi*, *G. pulchra* y *G. rosea*. Todas las especies presentan en sus apófisis tibiales dos ramas que emergen de una misma base pero difieren en la presencia de setas y espinas (Fig. 9 A-F). En todas las formas la rama retrolateral es más larga y presenta una espina en su parte superior. Mientras, el morfo marrón-rojo presenta en ambas ramas una serie de macrosetas, una mega espina en la base de la rama prolateral y una espina retrolateral (Fig. 9A). El

morfo negro de *G. anthracina* no presenta macrosetas y en la base de la rama prolateral presenta una espina, y 0-2 espinas tibiales retrolaterales (Fig. 9B). Los ejemplares de *G. iheringi* presentan una espina basal en la rama prolateral y una mega espina tibial retrolateral (Fig. 9C); *G. burzaquensis* presenta una espina basal en la rama prolateral y 2 espinas retrolaterales (Fig. 9D); y *G. pulchra* presenta una espina en la parte superior de la rama prolateral y otra espina en la base, así como una espina tibial retrolateral (Fig. 9E). En los ejemplares de *G. rosea* se observó una espina en la base de la rama prolateral y 1-2 espinas tibiales retrolaterales (Fig. 9F).

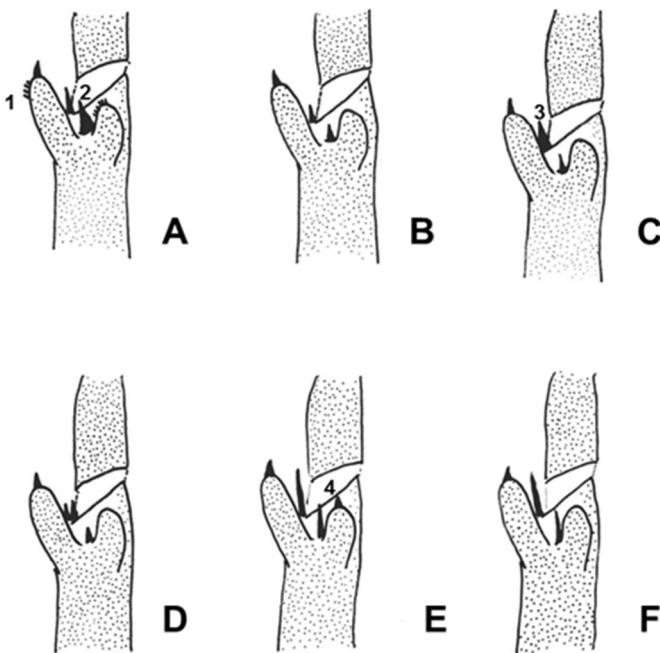


Figura 9. Vista ventral de la apófisis tibial de la pata I izquierda de machos del género *Grammostola*. A) *G. anthracina* morfo marrón-rojo. B) *G. anthracina* morfo negro. C) *G. iheringi*. D) *G. burzaquensis*. E) *G. pulchra*. F) *G. rosea*. 1- Macroseta, 2- Mega espina en la base de la rama prolateral, 3- Mega espina retrolateral, 4- Espina en la superficie de la rama prolateral.

DISCUSIÓN

Esta tesis recolectó evidencia geográfica, genética, y morfológica, para ser incluida a los datos ya conocidos de diferencias cromática y comportamentales, para clarificar el estatus taxonómico de la especie nominal *Grammostola anthracina*.

Luego de muestreos exhaustivos, no se encontraron zonas de solapamiento de ambos morfos. Se observaron dos situaciones en las que ambos morfos se encuentran en áreas muy cercanas (Fig. 8). En Paysandú, a unos kilómetros al norte de la ciudad, ambos morfos se recolectaron en dos sitios separados por 14 km. En Rivera ambos morfos se encontraron a una distancia de 7 km. En ambos casos los individuos del morfo marrón-rojo, pertenecen a registros de colección. En el trabajo a campo durante los años 2011-2013, en dichas zonas, se encontraron sólo individuos del morfo negro. La presencia de ambos morfos en estas áreas puede deberse al “efecto borde”, donde ambos morfos se encuentran en baja densidad. Otra posibilidad es que el morfo negro esté expandiéndose ocupando nuevos ambientes, desplazando al morfo marrón-rojo o viceversa. Los datos de colección del morfo marrón-rojo son relativamente recientes, por lo que se debería aumentar el esfuerzo de muestreo en éstas áreas “borde” para delimitar con más exactitud la distribución de los morfos en las mismas.

Las reconstrucciones filogenéticas recuperan a cada morfo como un grupo monofilético. Al no recuperarse como grupos hermanos, se refuerza la idea de que pertenecen a especies diferentes. *Grammostola burzaquensis* es hermana del clado que contiene al morfo marrón-rojo (en los análisis de

MP e IB); ésta última es una araña registrada en Uruguay para los departamentos de Treinta y Tres, Canelones y Rivera, y en Argentina. El morfo negro es el grupo hermano de *G. pulchra*, una araña que se distribuye en el Sur de Brasil. Siguiendo la metodología de delimitación de especies a través de métodos basados en árboles, podemos decir que el morfo negro y el marrón-rojo, son dos especies diferentes.

Estudios realizados en arañas por Barrett y Hebert (2005) revelaron que la distancia genética media mínima y máxima obtenidas para especies cogenéricas fue 6.5% y 23.1% para *Gnaphosa* (*Gnaphosidae*) y *Hypochylus* (*Hypochylidae*), respectivamente. Los valores de distancias genéticas obtenidas entre diferentes especies del género *Grammostola* fueron de 10-15%, indicando que la divergencia encontrada entre los morfos (10,3%) es del tenor observado en otros pares de especies.

La evidencia morfológica encontrada en las apófisis tibiales, permite una clara diferenciación de los dos morfos. Esta evidencia sumada a la evidencia cromática y comportamental (Costa & Pérez-Miles 2002, Postiglioni & Costa 2006) corrobora la hipótesis de trabajo de esta tesis. Las poblaciones uruguayas asignadas a *G. anthracina* pertenecen en realidad a dos especies biológicas distintas. El holotipo de *G. anthracina* procede de Montevideo, Uruguay; aun cuando la descripción del taxón carece de datos confiables sobre la coloración del tipo ni sobre la morfología de las apófisis tibiales, se podría inferir que pertenece al morfo marrón-rojo dado que Montevideo se encuentra incluido en el área de distribución de este morfo. Por lo tanto, en esta tesis se restringe el nombre *G. anthracina* al morfo marrón-rojo. Esta asignación debe ser evaluada a luz del estudio directo del

holotipo de *G. anthracina* que se encuentra depositado en el British Museum of Natural History (BMNH 90.7.1.388).

En relación a la identidad taxonómica del morfo negro, dada la topología de los árboles obtenidos, se comparó este morfo con la especie *G. pulchra*. Esta araña habita en Brasil (Platnick 2014) siendo su localidad tipo Uruguayana, Río Grande do Sul (Mello-Leitão 1921), muy próximo al límite con Artigas en Uruguay. Las características morfológicas de las apófisis tibiales estudiadas aquí de *G. pulchra* permite diferenciarlo del morfo negro. En las reconstrucciones filogenéticas, el morfo negro y *G. pulchra* aparecen como grupos monofiléticos recíprocos que difieren en el gen COI en más de un 10 %. Este alto nivel de divergencia, del orden del observado en otras comparaciones interespecíficas del género (Tabla 2), indica que se podría tratar de dos especies hermanas. De igual forma, es necesario revisar un número mayor de ejemplares de las colecciones.

El morfo marrón-rojo (i.e., *G. anthracina sensu stricto*) es genéticamente menos diverso (1.3%) que el morfo negro (5.5%). El morfo marrón-rojo presentó evidencia de una posible expansión demográfica reciente, aunque una de los dos pruebas realizadas no apoya este resultado. De esta forma, existen varios haplotipos compartidos entre diferentes localidades de este morfo, lo que es congruente con una expansión de rango reciente. Por otra parte, el morfo negro presenta poblaciones más estructuradas y aisladas genéticamente con todos los haplotipos exclusivos para cada localidad. Un muestreo geográfico más intenso permitirá plantear un escenario demográfico más detallado para ambos morfos.

CONCLUSIÓN

El estudio basado en secuencias de ADN y morfología de la especie nominal *Grammostola anthracina* permitió constatar que la misma está constituida por más de una especie biológica. Esto se evidenció con una clara diferenciación genealógica congruente con la delimitación de dos grupos morfológicos geográficamente segregados. Las genealogías obtenidas a partir de los haplotipos mostraron a los morfos marrón-rojo y negro como grupos monofiléticos que no son hermanos. Por último, e importante a destacar, se encontraron nuevos caracteres diagnósticos en las apófisis tibiales de los machos, que permiten discriminar ambas especies.

Grammostola anthracina corresponde a los ejemplares del morfo marrón-rojo. *Grammostola* sp “morfo negro” pertenece a una especie diferente a las que se estudiaron aquí. Habrá que hacer una revisión exhaustiva del género, para ver si se trata de una nueva especie para la ciencia o pertenece a alguna especie ya descripta. Al momento, podemos decir que en Uruguay existen 5 especies para el género *Grammostola*: *G. andreleetzi*, *G. anthracina*, *G. burzaquensis*, *G. iheringi*, y *G. sp* “morfo negro”. La perspectiva inmediata de este trabajo es realizar la determinación a nivel de especie del morfo negro. A mediano plazo habría que contemplar la actualización de una clave de identificación de especies del Uruguay. Por último, y a más largo plazo sería necesario ampliar el número de ejemplares, localidades y especies del género, en particular incluir ejemplares de *G. acteon* y *G. grossa*, para poder tener una filogenia completa del género tan complejo. A su vez, se

deberán incluir más genes y métodos de morfología comparativa.



G. anthracina



G. sp “morfo negro”

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astrin JJ, Huber BA, Misof B & Klütsch CF (2006) Molecular taxonomy in pholcid spiders (Pholcidae, Araneae): evaluation of species identification methods using CO1 and 16S rRNA. *Zoologica Scripta* 35:441-457.
- Avise JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447pp. (ISBN 0-674-66638-0).
- Avise JC & Robinson TJ (2008) Hemiplasy: A new term in the lexicon of phylogenetics. *Systematic Biology* 53:503-507.
- Bailey AL, Brewer MS, Hendrixson BE, Bond JE (2010) Phylogeny and classification of the trapdoor spider genus *Myrmekiaphila*: An integrative approach to evaluating taxonomic hypotheses. *PLoS ONE* 5:e12744.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.
- Barrett RD & Hebert PD (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 481-491.
- Baum DA & Donoghue MJ (1995) Choosing among alternative "phylogenetic" species concepts. *Systematic Botany*, 560-573.
- Baum DA & Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*, 53: 289-303.
- Bertani R (2000) Male palpal bulbs and homologous features in Theraphosinae (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology*, 28:29-42.

- Bertani R (2001) Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). Arquivos de Zoologia, São Paulo, 36:265–356
- Bond JE & Stockman AK (2008) An integrative method for delimiting cohesion species: Finding the population-species interface in a group of Californian trapdoor spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. Systematic Biology 57:628–646.
- Brown WM, George M & Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 76:1967-1971.
- Bücherl W (1951) Estudios sobre a biología e a sistemática do género *Grammostola* Simon, 1892. Monografias Instituto Butantan 1:1-203.
- Bücherl W (1957) Sobre a importância dos bulbos copuladores e das apófises tibiais dos machos na sistemática das aranhas caranguejeiras (Orthognatha). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 29: 377-416.
- Chang J, Song D & Zhou K (2007) Incongruous nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42:104-121.
- Cracraft J (1989) Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation, in D. Otte and J. A. Endler, Speciation and its consequences, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 28-59.

- Cracraft C (2002) The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 89:127-44.
- Costa F & Pérez-Miles F (2002) Reproductive biology of uruguayan theraphosids (Araneae, Mygalomorphae). *The Journal of Arachnology* 30:571-587.
- Costa F & Pérez-Miles F (2007) Cruel and irresponsible traffic of spiders in Uruguay. *Arachne* 12:40.
- Coyne JA & Orr HA (2004) Speciation. Sunderland. MA: Sinauer Associates. 545pp.
- Criscuolo F, Font-Sala C, Bouillaud F, Poulin N, Trabalon M (2010) Increased ROS Production: A Component of the Longevity Equation in the Male Mygalomorph, *Brachypelma albopilosa*. *PLoS ONE* 5(10): e13104. doi:10.1371/journal.pone.0013104
- 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.
- De Busschere C, Hendrickx F, Van Belleghem SM, Backeljau T, Lens L, & Baert L (2010) Parallel habitat specialization within the wolf spider genus *Hogna* from the Galápagos. *Molecular Ecology* 19:4029-4045.
- de Queiroz K (1999) The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. Pp.49-89 (Chapter 3) in: Species, New interdisciplinary essays (RA Wilson, ed.) MIT Press, Cambridge, Massachusetts. 325pp.

- de Queiroz K (2005) A unified species concept and its consequences for the future of taxonomy. Proceedings of the California Academy of Sciences 56:196-205.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. Systematic Biology 56:879-886.
- de Queiroz K & Donoghue MJ (1988) Phylogenetic systematics and the species problem. Cladistics 4:317-38.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM & Gascuel O (2008) *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Research. 36:W465-W469.
- Dimitrov D, Astrin JJ & Huber BA (2012) Pholcid spider molecular systematics revisited, with new insights into the biogeography and the evolution of the group. Cladistics 29:132-146.
- Doyle JJ (1992) Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. Systematic Botany 17:144-163.
- 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. doi: 10.1093/molbev/mss075.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
- Excoffier L & Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology

- Resources 10:564-567.
- Farris JS, Albert VA, Källerjö M, Lipscomb D & Kluge AG (1996) Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. Cladistics 12:99-124.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on the phylogenetics: approach using bootstrap. Evolution 39:783-791.
- Ferretti N, Pompozzi G & Pérez-Miles F (2011) The species of *Grammostola* (Araneae: Theraphosidae) from Central Argentina: taxonomy, distribution, and surface ultrastructure of coxal setae. Zootaxa 2828:1-18.
- Filatov DA (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. Molecular Ecology Notes 2:621-624.
- 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 3:294-9.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147:915-925.
- Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA & Moritz C (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. Trends in ecology and evolution 27:480-488.
- Fukushima C S, Pérez-Miles F & Bertani R (2011) On the Avicularia (Araneae: Theraphosidae: Aviculariinae) species from Uruguay. The Journal of Arachnology 39:528-532.
- Garb JE & Gillespie RG (2009) Diversity despite dispersal: colonization history and phylogeography of Hawaiian crab spiders inferred from multilocus genetic data.

Molecular Ecology 18:1746–1764.

- Gjerde I, Sætersdal M & Blom H (2007) Complementary hotspot inventory – A method for identification of important areas for biodiversity at the forest stand level. Biological Conservation 137:549–557.
- Goloboff PA (1993) A Reanalysis of Mygalomorph spider families (Araneae). American Museum Novitates 3056:1–32.
- Goloboff P, Farris S & Nixon K (2003) TNT: Tree analysis using New Technology Program and documentation, available from the authors, and at www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- Guidon S & Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology, 52:696–704.
- Hamilton CA, Formanowicz DR & Bond JE (2011) Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American tarantulas. PLoS ONE 6(10):e26207.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Proceedings of the Royal Society of London B 270:313–321.
- Hedin M & Bond JE (2006) Molecular phylogenetics of the spider infraorder Mygalomorphae using nuclear rRNA genes (18S and 28S): Conflict and agreement with the current system of classification. Molecular Phylogenetics and Evolution 41:454–471.
- Hendrixon BE & Bond JE (2005) Testing species boundaries in the *Antrodiaetus unicolor* complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): “Paraphyly” and cryptic diversity. Molecular Phylogenetics and Evolution 36:405–416.

- Hendrixon BE, DeRussy BM, Hamilton CA & Bond J (2013) An exploration of species boundaries in turret-building tarantulas of the Mojave Desert (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae, *Aphonopelma*). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 66:327-340.
- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK & Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18:597-603.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG & Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965-1978.
- Janowski-Bell ME & Horner NV (1999) Movement of the male brown tarantula, *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Theraphosidae), using radio telemetry. *The Journal of Arachnology* 27:503-512.
- Ji YJ, Zhang DX & He LJ (2003) Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes* 3:581-585.
- 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.
- Keith R & Hedin M (2012) Extreme mitochondrial population subdivision in southern Appalachian paleoendemic spiders (Araneae: Hypochilidae: *Hypochilus*), with implications for species delimitation. *Journal of Arachnology* 40:167-181.

- Knowles LL & Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* 56:887-895.
- Kuntner M & Agnarsson I (2011) Biogeography and diversification of hermit spiders on Indian Ocean islands (Nephilidae: Nephilengys). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59:477-88.
- Masta SE, Longhorn SJ & Boore JL (2009) Arachnid relationships based on mitochondrial genomes: Asymetric nucleotide and amino acid bias affects phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50:117-128.
- Mayr E (1942) Systematic and the origin of the species. Columbia University Press, New York.
- Mayr E (1995) Species, classification, and evolution. Pp. 3-12 in: *Biodiversity and Evolution* (R Arai, M Kato & Y Doi, eds). National Science Museum Foundation, Tokyo. 336 pp.
- Medrano JF, Aasen E & Sharow L (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Bio Techniques* 8:43.
- Mello-Leitão CF (1921) On the genus *Grammostola*, Simon. *Annals and Magazine of Natural History*, London 9:293-305, 1 map. Order: Araneae.
- Montes de Oca L, Pérez-Miles F (2009) Las arañas Mygalomorphae del Uruguay: clave para familias, géneros y especies. INNOTECH 4:41-49.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nixon KC (2002) WinClada ver. 1.00.08. Published by the author, Ithaca, NY.

- Oxbrough AG, Gittings T, O'Halloran J, Giller PS & Smith GF (2005) Structural indicators of spider communities across the forest plantation cycle. *Forest Ecology and Management* 212:171-183.
- Panario D (1988) Geomorfología del Uruguay. Propuesta de un marco estructural y un esquema de evolución del modelado del relieve uruguayo vol 1. Departamento Publicaciones. Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad de la República. 32pp.
- Pérez-Miles F (1985) Las especies del género *Grammostola* citadas para Uruguay (Araneae: Theraphosidae). Comunicación preliminar. Actas de las jornadas de zoología del Uruguay. p.4.
- Pérez-Miles F (1988) Variación relativa de caracteres somáticos y genitales en *Grammostola mollicoma* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology* 17:263-274.
- Pérez-Miles F, Lucas SM, da Silva Jr PI & Bertani R (1996) Systematic revision and cladistic analysis of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). *Mygalomorph* 1:33-68.
- Peters HJ (2000) Tarantulas of the world. Kleiner Atlas der Vogelspinnen - Band 1. Published by the author. 148pp.
- Peters HJ (2003) Tarantulas of the world: Amerika's Vogelspinnenn. Published by the author, Wegberg, Germany. 203pp.
- Peterson S, Mason T, Akber S, West R, White B & Wilson P (2006) Species identification of tarantulas using exuviae for international wildlife law enforcement. *Conservation Genetics* 8:495-502.

- Pétillon J, Georges A, Canard A, Lefreuve JC, Bakker JP & Ysnel F (2008) Influence of abiotic factors on spider and ground beetle communities in different salt-marsh systems. *Basic and Applied Ecology* 9:743-751.
- Platnick, NI (2014) The world spider catalog, version 14.5. American Museum of Natural History online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html> doi: 10.5531/db.iz.0001.
- Postiglioni R & Costa FG (2006) Reproductive isolation among three populations of the genus *Grammostola* from Uruguay (Araneae, Theraphosidae). *Iheringia, Série Zoologica Porto Alegre* 96:71-74.
- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Rambaut A & Drummond AJ (2007) Tracer v.1.5. Retrieved from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Raven RJ (1985) The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): Cladistics and systematic. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 182:1-180.
- Rix MG, Harvey MS (2012) Phylogeny and historical biogeography of ancient assassin spiders (Araneae: Archaeidae) in the Australian mesic zone: evidence for Miocene speciation within Tertiary refugia. *Molecular Phylogenetic Evolution* 62:375-96.
- Salter JD, Carstens BC & Hedin M (2013) Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Systematic Biology* doi: 10.1093/sysbio/syto41.
- Schiapelli RD & Gerschman BS (1962a) La importancia de las espermatecas en la sistemática de las arañas del

- suborden Mygalomorphae (Araneae). *Physis* 23:69-75.
- Schiapelli RD & Gerschman BS (1979) Las arañas de la subfamilia "Theraphosinae" (Araneae, Theraphosidae). *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales* 5:287-330.
- Sites JW & Marshal JC (2003) Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends of Ecology and Evolution* 18:462-470.
- Sites JW & Marshall JC (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 35:199-227.
- Shaw KL (1998) Species and the diversity of natural groups. Pp. 44-56 in: *Endless Forms: species and speciation* (D Howard & SH Berlocher, eds.). Oxford University Press.
- Snowman CV & Zigler KS (2010) Caves as islands: mitochondrial phylogeography of the cave-obligate spider species *Nesticus barri* (Araneae: Nesticidae). *The Journal of Arachnology* 38:46-56.
- Starret J & Hedin M (2007) Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology* 16:583-604.
- Stoltzey T & Shillington C (2009) Metabolic rates and movements of the male tarantula *Aphonopelma anax* during the mating season. *Canadian Journal of Arachnology* 87: 1210-1220.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S.

- (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Tanikawa A, Chang YH, & Tso IM (2010) Taxonomic revision of Taiwanese and Japanese Cyrtophora spiders hitherto identified with *C. moluccensis* (Arachnida: Araneae), using molecular and morphological data. *Acta Arachnologica* 59:31-38.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Weiß Ch (2007) StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. *Advances in Statistical Analysis* 98:339-341.
- Wiens JJ & Penkrot TA (2002) Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51:69-91.

ANEXO I

Protocolo de Extracción de DNA para tejidos animales DNeasy® Blood & Tissue Kit.

- 1- En un tubo de centrífuga de 1.5 ml: 10 mg de tejido + 180 ul ATL Buffer
- 2- Agregar 20 ul de proteinasa K. Mezclar con vortex. Incubar a 56 °C con agitación hasta que el tejido esté lisado completamente. Pasar por vortex de a ratos para dispersar la muestra. El tiempo de lisis puede variar entre 1 - 3 horas, 6 - 8 horas para cola de ratón, o dejar toda la noche. Opcional: agregar 4 ul de RNasa A (mezclar con vortex), incubar a temperatura ambiente por dos horas.
- 3- Pasar por vortex 15 segundos. Agregar 200 ul de AL Buffer a la muestra, mezclar con vortex. Agregar 200 ul de etanol, mezclar con vortex.
- 4- Colocar la mezcla anterior en las columnas de DNeasy Mini colocadas en el tubo colector. Centrifugar a . 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar tubo colector con contenido.
- 5- Colocar nuevo tubo colector. Agregar 500 ul de AW1 Buffer. Centrifugar durante 1 minuto a . 6000 x g (8000 rpm). Descartar tubo colector.
- 6- Colocar nuevo tubo colector. Agregar 500 ul de AW2 Buffer. Centrifugar durante 1 minuto a 20000 x g (14000 rpm). Descartar tubo colector.
- 7- Colocar la columna en un nuevo tubo de centrífuga. Pipetear 75 ul de AE Buffer. Incubar por 1 minuto a

temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para la extracción. No tirar tubo de centrífuga, allí está nuestro DNA. La extracción con 200 ul de AE disminuye la concentración de ADN.

- 8- Recomendación: repetir paso 7 para obtener más ADN.

ANEXO II

Protocolo de Extracción de ADN (Medrano et al. 1990)

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA ph 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5M), TE 1X ph 8 (autoclavado), etanol o isopropanol absolutos a -20°C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

- 1- Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 o 2 ml.
- 2- Opcional: Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 3- Agregar 500 ul de buffer de lisis y 10 ul de proteinasa K.
- 4- Incubar a 55 °C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 horas o hasta toda la noche.
- 5- Opcional: una hora antes de finalizar, agregar 5 ul de RNasa A.
- 6- Centrifugar al máximo (por ej., 15.000 rpm) por 15 minutos.
- 7- Pipetear 500 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiese).
- 8- Agregar 300 ul de cloruro de sodio, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 minutos.
- 9- Pipetear 500-600ul del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol a -20 °C o el doble de etanol a -20 °C. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.

- 10- Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20 °C por dos horas o toda la noche.
- 11- Centrifugar al máximo por 15 minutos. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
- 12- Lavar breve y cuidadosamente con unos 750 ul de etanol 70 %, evitando perder o disgregar el pellet.
- 13- Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37 °C (lleva unas dos horas).
- 14- Resuspender en 100ul de 1 x TE. Agitar, y opcionalmente incubar a 55 °C por 2 horas (o menos).
- 15- Guardar a -20 °C.

ANEXO IV

Haplótipos de *Grammostola anthracina* (excluyendo datos faltantes).

